

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-327699

(P2000-327699A)

(43) 公開日 平成12年11月28日 (2000. 11. 28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 0 7 K 7/06	Z N A	C 0 7 K 7/06	Z N A
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08		C 0 7 K 7/08	Z N A
C 0 7 K 7/08	Z N A	14/435	Z N A
14/435	Z N A	C 1 2 N 1/15	

審査請求 未請求 請求項の数28 O L (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-71710(P2000-71710)

(22) 出願日 平成12年3月15日 (2000. 3. 15)

(31) 優先権主張番号 特願平11-68316

(32) 優先日 平成11年3月15日 (1999. 3. 15)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(71) 出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72) 発明者 平原 一樹

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドおよびその用途

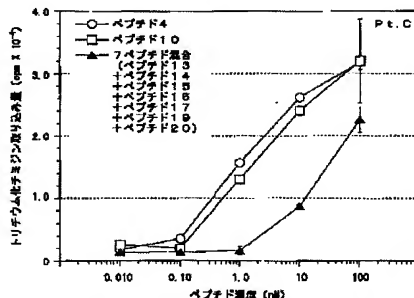
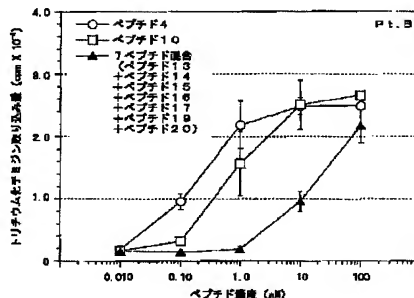
(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】 下記式 (I) :

$\alpha_1 - \alpha_2 - \alpha_3 - \alpha_4 - \alpha_5 - \alpha_6 - \alpha_7$ (I)

(式中、 α_1 乃至 α_7 は、それぞれ異なって、特定のアミノ酸配列を表す) で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体、および前記ペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体を有効成分として含む抗スギ花粉症剤。

【効果】 分子内に異なる6または7個のT細胞エпитープを含む本発明のペプチドは、それぞれのエピトープを混合して投与するよりも低用量で活性があり、患者への投与量を少なくすることができる。また、本発明のペプチドを有効成分として含んでなる抗スギ花粉症剤は、低用量にしてより広範なスギ花粉症患者に対して有効である。



ペプチド4およびペプチド10の7エピトープペプチド混合増強に比較しての相乗効果

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式(I)：

$$\alpha_1 - \alpha_2 - \alpha_3 - \alpha_4 - \alpha_5 - \alpha_6 - \alpha_7 \quad (I)$$

(式中、 α_1 乃至 α_7 は、それぞれ異なって、配列表の配列番号16または配列番号7、配列表の配列番号17、配列表の配列番号18または配列番号8、配列表の配列番号19、配列表の配列番号20または配列番号21、配列表の配列番号22および配列表の配列番号23からなる群より選択されるアミノ酸配列を表す)で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体。

【請求項2】 式(I)において、 α_1 乃至 α_7 が、それぞれ異なって、配列表の配列番号7、配列表の配列番号17、配列表の配列番号18または配列番号8、配列表の配列番号19、配列表の配列番号20、配列表の配列番号22および配列表の配列番号23からなる群より選択されるアミノ酸配列を表すことを特徴とする、請求項1記載のペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体。

【請求項3】 式(I)において、 α_1 乃至 α_7 が、それぞれ異なって、配列表の配列番号16または配列番号7、配列表の配列番号17、配列表の配列番号8、配列表の配列番号19、配列表の配列番号20、配列表の配列番号22および配列表の配列番号23からなる群より選択されるアミノ酸配列を表すことを特徴とする、請求項1記載のペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体。

【請求項4】 配列表の配列番号4で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項5】 配列表の配列番号5で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項6】 配列表の配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項7】 配列表の配列番号12のアミノ酸番号1から209で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項8】 配列表の配列番号13のアミノ酸番号1から96で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項9】 配列表の配列番号15のアミノ酸番号1から95で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項10】 下記式(II)：

$$\alpha_1 - \alpha_2 - \alpha_3 - \alpha_4 - \alpha_5 - \alpha_6 \quad (II)$$

(式中、 α_1 乃至 α_6 は、それぞれ異なって、配列表の配列番号16、配列表の配列番号18、配列表の配列番号19、配列表の配列番号20または配列番号21、配列表の配列番号22および配列表の配列番号23からなる群より選択されるアミノ酸配列を表す)で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体。

【請求項11】 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項12】 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項13】 配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項14】 配列表の配列番号10のアミノ酸番号1から185で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項15】 配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項16】 配列表の配列番号8で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項17】 請求項1乃至16のいずれか一つに記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNA。

【請求項18】 形質転換大腸菌*E. coli* pBR(h6-1) SANK 70199 (FERM BP-6642)、同*E. coli* pBR(h7-1) SANK 70299 (FERM BP-6643)および同*E. coli* pBR(h7-3) SANK 70399 (FERM BP-6644)からなる群から選ばれるいずれか一つの微生物に保持されるプラスミドベクターに組み込まれていることを特徴とする、請求項17記載のDNA。

【請求項19】 配列表の配列番号9のヌクレオチド番号4から558に示されるヌクレオチド配列を含むDNA。

【請求項20】 配列表の配列番号11のヌクレオチド番号4から630に示されるヌクレオチド配列を含むDNA。

【請求項21】 配列表の配列番号14のヌクレオチド番号4から288に示されるヌクレオチド配列を含むDNA。

【請求項22】 請求項17乃至21のいずれか一つに記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項23】 請求項17乃至21のいずれか一つに記載のDNAが、該DNAにコードされるアミノ酸配列からなるペプチドの発現を可能ならしめるベクター中に組み込まれていることを特徴とする、請求項22記載の組換えベクター。

【請求項24】 請求項22または23記載の組換えベクターを保持する宿主細胞。

【請求項25】 形質転換大腸菌*E. coli* pBR(h6-1) SANK 70199 (FERM BP-6642)、同*E. coli* pBR(h7-1) SANK 70299 (FERM BP-6643)および同*E. coli* pBR(h7-3) SANK 70399 (FERM BP-6644)からなる群から選ばれるいずれか一つの微生物であることを特徴とする、請求項24記載の宿主細胞。

【請求項26】 請求項23記載の組換えベクターを保

持する宿主細胞を、該ベクターに組み込まれた組換えDNAがコードするペプチドの生産が可能な条件下で培養し、次いで該培養物から該ペプチドを回収することを特徴とする、請求項1乃至16のいずれか一つに記載のペプチドの製造方法。

【請求項27】 請求項8記載のペプチドの製造方法であって、

1) 配列表の配列番号60に示されるヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を、該ヌクレオチド配列中のヌクレオチド番号1から642で示されるヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列からなるペプチドの発現が可能な条件下で培養する工程、

2) 次いで、1) で得られた培養物からペプチドを回収する工程、および、

3) さらに、2) で得られたペプチドをトリプシン消化してから、請求項8記載のペプチドを回収する工程、を含む方法。

【請求項28】 請求項1乃至16のいずれか一つに記載のペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体を有効成分として含む、抗スギ花粉症剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、スギ花粉アレルギーに特異的に反応するヒトT細胞を不活性化させるペプチド、およびそのペプチドを有効成分として含んでなる免疫療法剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 ここ数十年来、我が国においては、春先になるとスギ花粉症による鼻炎や結膜炎を訴える人の数が増加し続けている。スギ花粉症はアレルギー症の一種であり、その主因はスギ花粉中の抗原性物質、すなわちスギ花粉アレルギーであるといわれている。大気中に飛散したスギ花粉がヒトの体内に侵入すると、スギ花粉アレルギーに対するイムノグロブリンE抗体が産生される。この状態で次にスギ花粉が侵入すると、その花粉中のアレルギーとこのイムノグロブリンE抗体が免疫反応を起こし、アレルギー症状を呈することになる。

【0003】 スギ花粉中には抗原性の相違する少なくとも二種類のアレルギーが存在することが現在までに知られている。その一つは、ヤスエダらの文献[J. Allergy Clin. Immunol. 71, 77-86 (1983)] に報告されている「Cryj1」と呼ばれるタンパク質であり、もう一つはタニアイらの文献[FEBS Letters, 239, 329-332 (1988)] やサカグチらの文献[アレルギー、第45号、309-312頁(1990年)] に報告されている「Cryj2」と呼ばれるタンパク質である。なお、Cryj1、Cryj2とともに現在までにその全アミノ酸配列が決定されている[WO93/01213および特表平8-505284号公報参照]。

【0004】 スギ花粉中には、通常Cryj1とCryj2が約50:1ないし5:1の割合で存在し、花粉症患者から採取した血清のほとんどがCryj1にもCryj2にも反応するといわれている。なお、澤谷らの文献[アレルギー、第42巻、738-747頁(1993年)] には、皮内反応試験やRAST試験において、Cryj1とCryj2は同程度の抗原性を発揮すると報告されている。

【0005】 このように、スギ花粉アレルギーが既にいくつか分離され、その性質、性状もある程度解明されたことから、精製スギ花粉アレルギーをヒトに投与して減感作することにより、スギ花粉症を治療・予防できる見通しがついてきた。最近ではそのための減感作剤もいくつか考案されており、例えば特開平1-156926号公報や特開平3-93730号公報には、スギ花粉アレルギーに糖質を共有結合せしめ、生成した複合体を減感作剤としてヒトに投与する提案がなされている。

【0006】 しかしながら、アレルギー症の診断や減感療法には、通常高純度のアレルギーが大量に必要とされ、スギ花粉中のアレルギーは僅少である上に安定性が低く、スギ花粉症の診断剤や減感作剤をスギ花粉だけで賄おうとすると、多大の困難が伴う。このようなことから、最近のアレルギー疾患の治療・予防においては、これまでのように、患者にアレルギー全体を投与するのではなく、アレルギー中のT細胞が特異的に認識する最小領域、すなわち、本質的にT細胞エピトープのみからなる低分子のペプチドを投与する免疫療法が注目されている。

【0007】 一般に、アレルギーは、マクロファージなどの抗原提示細胞に取り込まれると、そこで消化され、消化断片が抗原提示細胞表面のHLA (Human Leukocyte Antigen) タンパク質に結合し、抗原提示されることとなる。抗原提示される断片は、HLAタンパク質に対する親和性などにより、アレルギーにおける一部の特定領域に限られ、かかる領域のうち、T細胞が特異的に認識する領域は、通常「T細胞エピトープ」と呼ばれる。実質的にT細胞エピトープのみからなるペプチドを投与する免疫療法には、

(i) ペプチドがB細胞エピトープを欠いている、すなわち、アレルギーに特異的なイムノグロブリンE抗体が反応しないので、従来の粗製または精製アレルギーで頻発していたアナフィラキシーなどの副作用が起こり得ない;

(ii) 少量からスタートし、有効投与量に達するまでの期間が、従来の減感作剤に比較して大幅に短縮できる;

(iii) 経口免疫寛容を誘導し、アレルギーに対するアレルギー反応を減弱することができる、などの利点がある。ただし、全てのスギ花粉症患者が共通のT細胞エピトープに一樣に反応するわけではなく、1種類のT細胞

胞エпитープのみを投与しても効果がない場合もあるので、まず患者がどのT細胞エпитープに反応するかを調べてから投与するか、もしくは複数のT細胞エпитープを調製してそれらを同時に投与しなければ確実な効果は期待できない。しかしながら、前者の方法では予め患者がどのT細胞エпитープに反応するかを調べなければならず、また後者の方法では複数のT細胞エпитープを別々に調製しなければならない。

【0008】そこで近年、複数の異なるT細胞エпитープを人工的に連結したペプチドを使用する試みがなされている〔例えば、特表平7-503362号公報参照〕。また、そのような連結T細胞エпитープはスギ花粉アレルギーでも作製されている〔特開平10-259198号公報参照〕。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の第一の課題は、従来知られているものよりも低用量で広範囲の人にスギ花粉症に対する予防または治療効果をもたらすことに優れた、スギ花粉アレルギー由来の異なる複数のヒトT細胞エпитープのアミノ酸配列が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを提供することにある。

【0010】本発明の第二の課題は、上記ペプチドをコードするDNAを提供することにある。本発明の第三の課題は、上記ペプチドの製造方法を提供することにある。本発明の第四の課題は、有効成分として上記ペプチドを含んでなる抗スギ花粉症剤を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、スギ花粉症に対する減感作療法剤としての効果に特に優れたT細胞エпитープの範囲を新たに限定した。さらに、それらT細胞エпитープを利用して、従来知られていたものよりも広範囲の人に対して優れたスギ花粉症の予防または治療効果を発揮し得るペプチドを作製した。一方、本発明者らは、連結された各T細胞エпитープ同士の間に関係のないアミノ酸が入らない本発明のペプチドは、それぞれのT細胞エпитープを単に混合したものよりも低用量でスギ花粉症の免疫療法に治療または予防効果を表すことを明らかにした。そして本発明者らは、これらペプチドを有効成分とするスギ花粉症の予防または治療剤を提供して本発明を完成させた。

【0012】すなわち本発明は、下記式(I)：

$$\alpha_1 - \alpha_2 - \alpha_3 - \alpha_4 - \alpha_5 - \alpha_6 - \alpha_7 \quad (I)$$

(式中、 α_1 乃至 α_7 は、それぞれ異なって、配列表の配列番号16または配列番号7、配列表の配列番号17、配列表の配列番号18または配列番号8、配列表の配列番号19、配列表の配列番号20または配列番号21、配列表の配列番号22および配列表の配列番号23からなる群より選択されるアミノ酸配列を表す)で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体；

下記式(II)：

$$\alpha_1 - \alpha_2 - \alpha_3 - \alpha_4 - \alpha_5 - \alpha_6 \quad (II)$$

(式中、 α_1 乃至 α_6 は、それぞれ異なって、配列表の配列番号16、配列表の配列番号18、配列表の配列番号19、配列表の配列番号20または配列番号21、配列表の配列番号22および配列表の配列番号23からなる群より選択されるアミノ酸配列を表す)で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体；配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列からなるペプチド；および配列表の配列番号8で示されるアミノ酸配列からなるペプチド、に関する。

【0013】以下、本発明を詳しく説明する。本発明は、以下に定義するA群、B、C群、D、E群、FおよびGの各アミノ酸配列群から1つずつ選ばれる6乃至7種類、より好ましくは7種類のアミノ酸配列を順不同に連結したもの、その複合体、その誘導体またはその重合体を提供するものである：

A群： 配列表の配列番号16に示されるアミノ酸配列(以下「A」という)または配列表の配列番号7に示されるアミノ酸配列(以下「A'」という)；

B： 配列表の配列番号17に示されるアミノ酸配列；

C群： 配列表の配列番号18に示されるアミノ酸配列(以下「C」という)または配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列(以下「C'」という)；

D： 配列表の配列番号19に示されるアミノ酸配列；

E群： 配列表の配列番号20に示されるアミノ酸配列(以下「E」という)または配列表の配列番号21に示されるアミノ酸配列(以下「E'」という)；

F： 配列表の配列番号22に示されるアミノ酸配列；

G： 配列表の配列番号23に示されるアミノ酸配列。

【0014】また、本発明は、新規なヒトT細胞エпитープを構成するアミノ酸配列を有し、スギ花粉症に対する減感作療法剤の有効成分として有用な、上記アミノ酸配列A'またはC'を有するペプチドを提供する。ここに、「ヒトT細胞エпитープを構成するアミノ酸配列」とは、スギ花粉症患者由来の末梢血単核細胞群を該アミノ酸配列を有するペプチドの存在下で培養したときに、該末梢血単核細胞群のDNA合成速度を、該アミノ酸配列を有するペプチドの非存在下で培養した末梢血単核細胞群の2倍を越える速度、より好ましくは5倍以上の速度にする活性を有するようなアミノ酸配列をいう。上記において、E群、FおよびGはスギ花粉アレルギーCryj1由来のヒト主要T細胞エпитープを構成するアミノ酸配列の群であり、その他は全てCryj2由来のヒト主要T細胞エпитープを構成するアミノ酸配列の群である。

【0015】さらに、本発明における好ましいペプチドとして、下記の例を挙げることができる：

ペプチド1(配列表の配列番号1)；

ペプチド2(配列表の配列番号2)；

ペプチド3 (配列表の配列番号3) ;
 ペプチド4 (配列表の配列番号4) ;
 ペプチド5 (配列表の配列番号5) ;
 ペプチド6 (配列表の配列番号6) ;
 ペプチド7 (配列表の配列番号7) ;
 ペプチド8 (配列表の配列番号8) ;
 ペプチド9 (配列表の配列番号10のアミノ酸番号1から185) ;
 ペプチド10 (配列表の配列番号12のアミノ酸番号1から209) ;
 ペプチド11 (配列表の配列番号13) ; および
 ペプチド12 (配列表の配列番号15のアミノ酸番号1から95) 。

【0016】なお、上記ペプチド1は、スギ花粉アレルゲンタンパク質のヒト主要T細胞エピトープを構成するアミノ酸配列が、N末からA-E-C-D-G-Fの順に連結されたアミノ酸配列を有する。同様に、ペプチド2乃至6は下記のような構造を有する：

ペプチド2： A-E'-C-D-F-G ;
 ペプチド3： A-E'-C-D-G-F ;
 ペプチド4： B-A-E-C-D-F-G ;
 ペプチド5： B-A'-E-C'-D-F-G。

【0017】ペプチド6は、ペプチド5のN末端側に、アミノ酸4残基からなる配列Gly-Asp-Pro-Argが付加されたアミノ酸配列を有する。ペプチド7、ペプチド8は、それぞれ上記A'、C'のアミノ酸配列を有するペプチドそのものである。

【0018】ペプチド9は、A-E-C-D-F-Gで表される構造を有する単位 (以下「H6-1」という。配列表の配列番号25のアミノ酸番号4から84) と、下記のアミノ酸配列を有するリンカーペプチド：

Thr-Met-Ile-Thr-Asn-Ser-Ser-Ser-Val-Pro-Gly-Asp-Pro-Arg

(L1、配列表の配列番号26) ; Arg-Ala-Asp-Pro-Arg (L2、配列表の配列番号27) ; およびArg-Ala-Asp-Leu (L3、配列表の配列番号80) とが、

(L1) - (H6-1) - (L2) - (H6-1) - (L3)

のように連結された重合体構造を有する。なお、これらリンカーはスギ花粉アレルゲンとは無関係であり、組換えDNA技術を利用して大腸菌にH6-1の重合体を簡便に生産させるために付加もしくは挿入されたものであるが、ペプチド9の活性自体に影響を与えるものではない。同様に、ペプチド10は、A-E-C-D-F-G-Bで表される構造を有する単位 (以下「H7-1」という。配列表の配列番号29) と、上記リンカーペプチドとが、

(L1) - (H7-1) - (L2) - (H7-1) - (L3)

のように連結された構造を有する。

【0019】これら重合体構造を有するペプチドは、短いリンカーが介在するものであるが、上記のように単量体と同様の効果を有し、組換えDNA技術によって簡便に、かつ大量に生産可能という利点を有する。後の実施例で記載するように、この重合体はそのまま使用可能であるが、分解して単量体として使用することもできる。また、ペプチド12は、A'-E-C'-D-F-G-Bで表される構造を有し、ペプチド11はペプチド12のC末端にArgが付加された構造を有する。

【0020】また、上記に挙げたもの以外のT細胞エピトープの順列、例えばA'-B-C'-D-E-F-GやG-F-E-D-C'-B-A'等も、本発明のペプチドとして好適である。さらに、A'、B、C'、D、E、FおよびGの7種のT細胞エピトープの順列は、上記を含め7×6×5×4×3×2×1=5040通りとなり、これらのT細胞エピトープを連結したペプチドは5040通りの構造をとり得ることとなるが、本発明のペプチドは、後述する、スギ花粉アレルゲンに特異的なT細胞のトリチウム化チミジンの取り込みを測定する方法により調べた場合、T細胞エピトープ活性が陽性であればよく、その順列自体は特に限定されないもので、それらのペプチドも本発明に包含される。

【0021】上記のペプチドのうち、本発明においてより好適なものはペプチド4、5、6、10、11および12からなる群から選ばれるペプチドであり、特に好適なものはペプチド5、6、11および12からなる群から選ばれるペプチドであり、最も好適なものはペプチド11または12である。

【0022】さらに、本発明のペプチドは、上記のような構成に加えて、T細胞エピトープを連結したもののN末端および/またはC末端に、T細胞エピトープの構成とは無関係の付加的アミノ酸配列が存在するものも包含する (例えば、ペプチド6のN末端のGly-Asp-Pro-Argで表される配列、ペプチド9または10のリンカー、ペプチド11のC末端のArg等)。そのような付加的アミノ酸配列の構造は、本発明のペプチドのT細胞エピトープ供与体としての機能を損なうようなものや、またはヒトに投与された際に毒性等何らかの有害な活性を有するようなものでない限り、特に限定されない。

【0023】特に、ペプチド11は、後に記載する、本発明に係る製造方法によって得られるものであり、Argが付加してもペプチド12と同様の効果を有するものである。また、本発明者らは、本発明のペプチドを得る方法を種々検討し、本発明の目的を達成するために好適なDNA、組換えベクター、宿主細胞、及びペプチドの製造方法を見出した。更に本発明者らは、本発明に係るペプチドを有効成分として含む抗スギ花粉症剤が、より広範なスギ花粉症患者に対して有効であると共に、低用量で活性があり、投与量を少なくすることができることを見出した。

【0024】

【発明の実施の形態】本発明に記載のペプチドは、「固相法」または「液相法」として知られる斯界において慣用のペプチド合成法により調製することができる。例えば、社団法人日本生化学会編「新生化学実験講座」、第1巻、「タンパク質VI」、第3～44頁、1992年、東京化学同人発行などにはペプチド合成の詳細が記載されている。また、該ペプチドは、マルチペプチドシンセサイザー（シンフォニー、プロテインテクノロジー社製）を用い、Fmoc (9-fluorenyl methyloxycarbonyl) 固相合成法にて同装置のプロトコールに従って合成することができる。すなわち、合成する各ペプチドのC末端に相当するアミノ酸が導入されているFmoc-L-アミノ酸Wang樹脂（またはCl-Trt樹脂）を上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、デプロテクション溶液を用いてFmocを除く。さらにC末端から2番目のアミノ酸に相当するアミノ酸溶液とアクチベーター溶液を反応せしめ、反応後再びFmoc基のデプロテクションを行い、同様の操作を繰り返すことにより、目的とするペプチドを合成することができる。なお、上記の方法では、一般に合成しようとするペプチドが長くなると収率が低下する傾向があるが、下記の実施例に示すように、予め樹脂に導入されているC末端アミノ酸の一部を不活性化して、以後の反応が可能なC末端アミノ酸の数を減らしておくことにより、高収率を維持することが可能である。

【0025】本発明のペプチドは化学合成により調製されたものに限定されず、組換えDNA技術により調製したものであってもよく、例えば、上記ペプチド1乃至12のいずれかをコードするDNAを調製し、これを自立増殖可能なベクターに挿入したものを大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母等の宿主に導入して形質転換体とし、その培養物から本発明のペプチドを採取してもよい。

【0026】従って本発明は、上記の本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNAを提供する。本発明において、特に、後述の形質転換大腸菌に保持されるプラスミドベクターに組み込まれているものが好適に使用しうる。別の観点として、本発明は、上記DNAを含む組換えベクターを提供する。本発明において、組換えベクターとしては、上記DNAにコードされるアミノ酸配列からなるペプチドの発現を可能ならしめるベクター中に組み込まれているものが好適に使用しうる。

【0027】所望のヌクレオチド配列を有するDNAを調製する方法としては、例えば、該所望のDNAの部分配列ヌクレオチドであって、両端がオーバーラップするようなセンスおよびアンチセンスヌクレオチドを化学合成し、次いでポリメラーゼ連鎖反応 [Saiki, R. K. et al (1988) Science 239, 487-491参照] 等のDNAポリメラーゼ反応やリガーゼ反応を利用することにより、それら部分配列が連結したものを得る方法等が挙げられ

る。例えば、そのようにして人工合成された本発明のペプチドをコードするDNAが組み込まれたベクターで形質転換された微生物として、ペプチド9をコードするDNAが組み込まれたベクター、ペプチド10をコードするDNAが組み込まれたベクター、および、ペプチド11またはペプチド12をコードするDNAが組み込まれたベクターでそれぞれ形質転換された大腸菌株 *E. coli* pBR(h6-1) SANK 70199、*E. coli* pBR(h7-1) SANK 70299および *E. coli* pBR(h7-3) SANK 70399が1999年2月9日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託されており、それぞれ受託番号FERM BP-6642、FERM BP-6643およびFERM BP-6644が付されている。本発明のペプチドをコードするDNAとして最も好適なものは上記寄託菌株から通常の遺伝子工学的手法により得ることができるが、本発明のペプチドをコードするDNAはこれらに限定されない。

【0028】上記のごとくして得られる本発明のペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを好適なベクターに組み込むことにより、原核生物または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質転換にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において該DNAを発現させることができる。すなわち本発明はまた、本発明のペプチドの発現を可能ならしめるベクター中に本発明のDNAが組み込まれている組換えベクターを保持する宿主細胞に関する。

【0029】原核細胞の宿主としては、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*) や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 等が挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質発現させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起点および調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させればよい。またベクターは形質転換細胞に表現形質（表現型）の選択性を付与することができる配列を持つものが望ましい。例えば大腸菌としては *E. coli* K12株、JM109株等がよく用いられ、ベクターとしては一般にpBR322やpUC系のプラスミドがよく用いられるが、これらに限定されず、公知の各種の菌株およびベクターがいずれも利用できる。

【0030】プロモーターとしては、大腸菌においてはトリプトファン (*trp*) プロモーター、ラクトース (*lac*) プロモーター、トリプトファン・ラクトース (*tac*) プロモーター、リボプロテイン (*lpp*) プロモーター、バクテリオファージ由来のラムダ (λ) PLプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子Tu (*tuf*) Bプロモーター、*lacUV5* プロモーター等が挙げられ、いずれのプロモーターも本発明のペプチドの産生に使用することができる。

【0031】枯草菌としては、例えば207-25株が好ましく、ベクターとしてはpTUB228 [Ohmura, K., et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93 参照] 等が用いられるが、これに限定されるものではない。枯草菌用プロモーターとしては、枯草菌の α -アミラーゼ遺伝子の調節配列がよく用いられ、さらに必要により α -アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードするDNA配列を連結することにより、菌体外での分泌発現も可能となる。

【0032】宿主細胞として大腸菌を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、pBR322複製起点を有し、大腸菌において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、翻訳開始シグナルを備えたものを用いることができる。該発現ベクターはカルシウムクロライド法 [Mandel, M. and Higa, A. (1970) J. Mol. Biol. 53, 154参照]、Hanahanの方法 [Hanahan, D. and Meselson, M. (1980) Gene 10, 63 参照] および電気パルス穿孔法 [Neumann, E., et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845 参照] 等により大腸菌に取り込ませることができ、かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

【0033】真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞 [Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182 参照] やチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 [Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220参照]、ヒトナマルバ細胞、ハムスターBHK細胞等がよく用いられるが、これらに限定されない。

【0034】脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現させようとする遺伝子の5'に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリAデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr [Subramani, S., et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854-864参照] 等を例示できるが、これに限定されない。

【0035】また真核微生物としては酵母が一般によく用いられており、その中でもサッカロミセス属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) が好ましい。該酵母等の真核生物の発現ベクターとしては、例えばアルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター [Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025 参照] や酸性ホスファターゼ遺伝子のプロモーター [Miyahara, A., et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5参照] 等を好ましく利用できる。

【0036】宿主細胞として、COS細胞を用いる場合

を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自立増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写集結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法 [Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308 参照]、リン酸カルシウム-DNA共沈澱法 [Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology 52, 456-457 参照] および電気パルス穿孔法 [Neumann, E., et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845 参照] 等によりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共にG418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo [Sambrook, J., et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY参照] やpSV2neo [Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341 参照] 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより本発明のペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

【0037】上記のように、本発明において、宿主細胞は本発明のペプチドを産生するように形質転換されたものであればいずれでも良く、特に制限されるものではないが、例えば先に記載したように、ペプチド9をコードするDNAが組み込まれたベクター、ペプチド10をコードするDNAが組み込まれたベクター、および、ペプチド11またはペプチド12をコードするDNAが組み込まれたベクターでそれぞれ形質転換された大腸菌株 *E. coli* pBR(h6-1) SANK70199、*E. coli* pBR(h7-1) SANK70299および*E. coli* pBR(h7-3) SANK70399 (受託番号FERMBP-6642、FERMBP-6643およびFERMBP-6644) は、既に国際寄託されており、本発明の実施において好適に使用することができる。

【0038】上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞外に本発明のポリペプチドが生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、大腸菌であればトリプトン-イースト培地 (バクトトリプトン 1.6%、イーストエキストラクト 1.0%、塩化ナトリウム 0.5% (pH7.0)) やペプトン培地 (ディフコ社製) 等を使用できる。また、上記COS細胞であればRPMI 1640培地やダルベッコ修正イーグル培地 (DMEM) 等の培地に必要に応じてウシ胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したものを使用できる。

【0039】上記により、形質転換体の細胞内または細胞

胞外に生産される本発明のペプチドは、該蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離・精製することができる。かかる方法としては、具体的には例えば通常の蛋白質沈澱剤による処理、限外ろ過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲルろ過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。外来遺伝子を大腸菌等に導入して大量発現させた場合、産生されたペプチドが、封入体と呼ばれる水に不溶の集塊を形成することがある。そのような場合、グアニジンイソチオシアネート等の強力な変性剤を用いて該ペプチドを変性させることにより該ペプチドを可溶化することができる。

【0040】さらに、本発明のペプチドは、かくして得られるペプチドに糖質やポリエチレングリコールを付加して得られる複合体としての形態、さらには、ペプチドをアセチル化、アミド化および／または多官能試薬により架橋重合させて得られる誘導体または重合体としての形態であってもよい。そのような本発明のペプチドの複合体、誘導体または重合体の製造にあたっては、糖質等の付加、アセチル化、アミド化および／または架橋重合は、本発明のペプチド中のスギ花粉アレルゲンタンパク質由来のヒトT細胞エпитープを構成するアミノ酸配列の機能を損なわないよう、前記した本発明のペプチドのN末端および／またはC末端の付加的ペプチド、もしくはリンカーペプチドにおいて行われることが好ましい。

【0041】本発明のペプチドの複合体としては、例えばN末端またはLys残基のアミノ基にポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、さらには、プルラン、エルシナンなどのマルトトリオースを反復単位とする多糖類を付加したもの等、本発明の技術分野における当業者に周知のものを挙げることができ、これらは例えば社団法人日本生化学会編「新生化学実験講座」第1巻「タンパク質IV」第236～252頁（1991年、東京化学同人発行）等の記載に従って製造することができる。

【0042】また、本発明のペプチドの誘導体としては、例えばN末端をアセチル化したもの、C末端Gly残基をアミド化したもの等、本発明の技術分野における当業者に周知のものを挙げることができる。かかる誘導体は、例えば上記「新生化学実験講座」第1巻「タンパク質IV」第18～20頁および同第9巻「ホルモンI」第290～298頁（いずれも1991年、東京化学同人発行）等の記載に従って製造することができる。さらに、本発明のペプチドの重合体としては、例えばジスクシイミジルスベレート等の二価性架橋試薬により本発明のペプチド2分子を重合したもの等、本発明の技術分野における当業者に周知のものを挙げることができる。かか

る重合体の調製は、例えば上記「新生化学実験講座」第1巻「タンパク質IV」第207～226頁の記載に従って行うことができる。

【0043】更に本発明において、DNA組換え技術によるペプチドの製造方法が提供される。特に重合体構造を有するペプチドをコードするDNAから、単量体を簡便に得る方法が提供される。例えば、プロテアーゼで特異的に切断可能なアミノ酸配列を含むリンカーペプチドを介して本発明のペプチドが複数個連結しているような重合体を大腸菌等の宿主に生産させてから、該プロテアーゼで該重合体を消化することにより、本発明のペプチドを得ることもできる。その際、該重合体は本発明のペプチドの一つが重合したホモ重合体または複数種の本発明のペプチドが重合したヘテロ重合体のいずれでもよいが、単一のペプチドを大量に生産させることを目的とする場合には、ホモ重合体を選択される。またプロテアーゼは、特定のアミノ酸配列を認識して切断するものであれば、公知のものをいずれも使用することができるが、好適にはトリプシン、カテプシンB、カテプシンD、カテプシンE等である。

【0044】本発明のペプチドは、比較的粗な形態で投与しても所期の治療・予防効果を発揮するが、通常は使用に先立って精製される。精製には、例えば、ろ過、濃縮、遠心分離、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などのペプチドないしタンパク質を精製するための斯界における慣用の方法が用いられ、必要に応じて、これら方法を適宜組合わせればよい。そして、最終使用形態に応じて、精製したペプチドを濃縮、凍結乾燥して液状または固状にすればよい。本発明のペプチドがT細胞エпитープとしての活性を有することは、スギ花粉アレルゲンに特異的なT細胞のトリチウム化チミジンの取込みを計測することにより確認することができる。この計測には、例えば以下に記載する方法を用いることができる。

【0045】すなわち、フィコール・ハイバック比重遠心法等によりスギ花粉症患者の末梢血単核細胞群を分離し、この細胞群をRPMI 1640等の培地に浮遊させ、96穴マイクロプレート上に分注する。次に、被検物質であるペプチドを加え培養する。この培養時の温度、時間等の条件は各実験毎に適宜調整することができるが、37℃、3日間が好適である。その後トリチウム化チミジンを培地に加え、さらに一定時間培養を続け、単核細胞群におけるトリチウム化チミジンの取込み量を測定することにより、本発明のペプチドのT細胞エпитープとしての活性を算定することができる。なお、本発明では、同時にペプチドを含まない系を設けてこれを陰性対照とし、トリチウム化チミジンの取込み量が陰性対照の2倍を越える値に達した系を「陽性」、達しなかつ

た系を「陰性」とした。

【0046】本発明のペプチドがスギ花粉症に対する治療効果を有することは、例えば以下の実験により確認することができる。なお、本発明のペプチドはヒトT細胞特異的な活性を有するため、ヒト以外の動物で実験を行なってもその効果が現れない場合があるが、例えばC3H/HeNマウスのリンパ球は上記A群に含まれるペプチドに対して反応性を有するので、A群のアミノ酸配列を必ず含む本発明のペプチドに関しては、以下に記載するような方法でその効果を評価することができる。

【0047】予めC3H/HeNマウスに対し本発明のペプチドを投与し、該ペプチドに対する免疫寛容を誘導しておく。一定期間経過後に当該マウスに以下に記載するアミノ酸配列を有するCryj2のヒト主要T細胞エピトープペプチド：

Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp
(ペプチド13；配列表の配列番号16)をフロイントの完全アジュバント等のアジュバントとともに投与し免疫する。さらに、一定期間経過後に当該マウスの膝窩部等からリンパ節細胞を摘出し細胞懸濁液を調製する。これに上記ペプチド13またはCryj2を添加して培養を継続し、さらにトリチウム化チミジンを添加して、トリチウム化チミジンの取込み量を測定することにより、T細胞の増殖を測定することができる。

【0048】予め本発明のペプチドで免疫寛容を誘導していないマウスでは、ペプチド13による免疫化によりそのペプチドに特異的なT細胞が活性化され、イン・ビトロにおいて抗原提示細胞により提示されたペプチド13またはCryj2の部分ペプチドに反応し増殖する。一方、予め本発明のペプチドで免疫寛容を誘導したマウスでは、その後ペプチド13による免疫を行なってもそのペプチドに特異的なT細胞は活性化されず、イン・ビトロにおいて抗原提示細胞により提示されたペプチド13またはCryj2の部分ペプチドに反応せず増殖しない。その差を測定することにより、本発明のペプチドのスギ花粉症に対する治療効果を確認することができる。

【0049】本発明のペプチドは、スギ花粉アレルゲンに特異的なイムノグロブリンE抗体と実質的に反応しないので、ヒトを含む哺乳類一般に投与すると、実質的にアナフィラキシーを引き起こすことなく、スギ花粉アレルゲンに特異的なT細胞を不活性化することができる。

【0050】本発明のペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体を有効成分として含む本発明の抗スギ花粉症剤は、スギ花粉症に罹患した患者に投与すると、アナフィラキシーなどの副作用を実質的に引き起こすことなく、スギ花粉症を治療することができる。一方、本発明の抗スギ花粉症剤をスギ花粉が飛散しはじめ前に健康な個体や潜在的なスギ花粉症の個体に投与するときには、スギ花粉症に対して顕著な予防効果を発揮するとともに、発症時のアレルギー症状の寛解に著効を

発揮する。

【0051】本発明の抗スギ花粉症剤につきさらに詳しく説明すると、本発明の抗スギ花粉症剤は通常、本発明のペプチド、その複合体、その誘導体またはその重合体の1種または2種以上を0.01乃至100% (w/w)、好ましくは0.05乃至50% (w/w)、さらに好ましくは0.5乃至5.0% (w/w) 含んでなる。本発明の抗スギ花粉症剤は、当該ペプチド単独の形態はもとより、それ以外に生理的に許容される、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、グルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、マンニトール、プルランなどの担体、賦形剤、免疫助成剤、安定剤、さらには必要に応じてステロイドホルモンやクロモグリク酸ナトリウムなどの抗炎症剤や抗ヒスタミン剤、抗ロイコトリエン剤、抗タキキニン剤を含む1種または2種以上の他の薬剤と組み合わせた組成物としての形態を包含する。さらに、本発明の抗スギ花粉症剤は、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、本発明のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体を、例えば、1日当たりの用量またはその整数倍(4倍まで)またはその約数(1/40まで)に相当する量を含むし、投与に適する物理的に分離した一体の剤形にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、散剤、細粒剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、乳剤、軟膏剤、硬膏剤、パップ剤、坐剤、点眼剤、点鼻剤、噴霧剤、注射剤などが挙げられる。

【0052】本発明の抗スギ花粉症剤は、スギ花粉症の治療または予防を目的に、経口、経皮、点鼻、点眼または注射投与される。ヒトにおける投薬量は、投与の目的や方法、症状によっても変わるが、通常、対象者の症状や投与後の経過を観察しながら、成人1日当たり0.01乃至1000mg、好ましくは1乃至10mgを目安に、毎日1回乃至毎月1回の頻度で、約1乃至6ヶ月間、通常、用量を増やしながら反復投与される。

【0053】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによりその技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】 ペプチド1

樹脂に固定したアミノ酸誘導体に、1個ずつアミノ酸をカルボキシル末端側から結合させていく方法(固相合成法)でペプチドを化学合成した。ペプチド1(配列表の配列番号1)の合成は、合成状況を確認する目的、および合成機に試薬を追加する目的のために、以下に記載するように5段階に分けて行なった。

【0054】1) 長鎖ペプチドの合成は、樹脂上に合成されるペプチド鎖の割合を少なくすることにより可能となるのではないかと考えられた。そこで固相合成に用

いている樹脂に予め導入されているC末端アミノ酸の α -アミノ基を一部アセチル基でブロックし、樹脂上に合成されるペプチドの割合を減らして長鎖ペプチドの合成を試みた。

【0055】各サイクルで使用するアミノ酸は α -アミノ基および残基部分の反応基が保護基でブロックされた特殊なアミノ酸誘導体を用いた。例えば、それぞれのアミノ酸誘導体の α -アミノ基はFmoc(9-フルオレニル・メチロキシカルボニル)によりブロックされている。ペプチド合成は、樹脂に結合したアミノ酸の α -アミノ基のFmocを脱保護し、次にカルボキシル基が活性化したアミノ酸誘導体を結合させるといった反応を順次繰り返して行なった(Fmoc法)。

【0056】C末端にProを有するペプチドの合成に、Fmoc法で汎用されるWang樹脂を用いると、ペプチド鎖が樹脂から欠落しやすいことが知られているので、ペプチド1の固相合成法用の樹脂としては2-クロロトリチル(2-Cl-Trt)樹脂(以下「Cl-Trt樹脂」という)を用いた。

【0057】ペプチド1のC末端残基に相当するアミノ酸(Pro)が導入されているPro-Cl-Trt樹脂の100 μ mol相当を15ml容ポリプロピレン製コニカルチューブに入れ、96 μ molの無水酢酸を含むCAP液(ジメチルホルムアミド:N-メチルモルホリン:無水酢酸=520:1:1(体積比))5mlを加えて室温で30分間静置した。この操作により、樹脂に導入されている多数のC末端アミノ酸の α -アミノ基の一部がアセチル基でブロックされ、後のペプチド合成はブロックを免れた α -アミノ基からのみ進行するので、樹脂上に合成されるペプチドの最大数が減少する。

【0058】この樹脂をペプチド合成機・シンフォニー(アロカ社製)用の使い捨てプラスチック製反応ベッセルに入れ、樹脂をジクロロメタンで洗浄した後、ペプチド合成機・モデル430A(アプライドバイオシステムズ社製)用の反応ベッセルに移し、該合成機を用いFmoc固相合成法(同装置のファストモック法(FastMoc Chemistry))に従って合成を行なった。まずC末側から2番目のアミノ酸の誘導体であるFmoc-Asp(OtBu)1mmolに、アクチベーター溶液(2M ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)/N-メチルピロリドン(以下「NMP」という)1mlと0.45M 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェート(HBTU)/1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)/ジメチルホルムアミド2.2mlおよびNMP1mlを加えて活性化したもの(結合アミノ酸に対して10倍等量)と、先のアセチル基でブロックした樹脂を室温で反応させるが、その際、アミノ酸の結合を十分に行なわせる目的で、この反応を2回繰り返すダブルカップリング法を用いた。またこのとき、Pro-Cl-Trt

樹脂にアミノ酸が結合しにくいと、反応時間を120分(通常は30分)とした。

【0059】ここで生成したFmoc-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂をNMP7mlで7回洗浄後、デプロテクション溶液(ピペリジン/NMP)7mlを3分間、12分間と2回反応させ、樹脂に結合しているアミノ酸のFmoc基を除き、NMP液7mlで5回洗浄した。次にC末側から3番目のアミノ酸の誘導体である活性化Fmoc-Tyr(tBu)溶液をダブルカップリング反応させた。以下、同様の操作を繰り返した。ただし、Fmoc基のデプロテクション溶液のピペリジン濃度は、23%(1サイクル目)から36%(20サイクル目)へと、合成するペプチドの長さに従って漸次上昇させた。

【0060】上記の方法でC末端から21残基目までのペプチド:Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。1mgの上記樹脂を採取し、6N塩酸にて110℃で24時間加水分解を行なった後、遊離したアミノ酸をアミノ酸分析計(L-8500型、日立製作所(株)社製)にて測定した。その結果、樹脂に結合しているペプチドは、樹脂置換量の20%程度であることが判明した。

【0061】さらに一部樹脂を採取し、樹脂に0.5mlのクリベージ溶液(トリフロロ酢酸(以下「TFA」という):エタンジチオール:水:トリイソプロピルシラン=92.5:2.5:2.5:2.5)を加え1時間クリベージ反応を行い、得られたペプチド溶液にエーテルを加えペプチドを沈殿させた[1997/98ペプチド合成ハンドブックS48;Novabiochem社]。得られたペプチドについて質量分析計(VGブラットフォーム、VGバイオテック社製)を用いてエレクトロスプレーイオン化ゼーション(electrospray ionisation、以下「ESI」という)法にて分子量を測定し、合成産物の確認を行なった。

【0062】2) 上記1)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から31残基目までのペプチド:Fmoc-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後合成を中断した。一部樹脂を取り出し、クリベージ反応を行い、上記1)と同様の方法で合成産物の確認を行なった。

【0063】3) 上記2)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から51残基目までのペプチド:Fmoc-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-G

Ile-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後合成を中断した。一部樹脂を取り出し、クリベージ反応を行い、上記1)と同様の方法で合成産物の確認を行なった。

【0064】4) 上記3)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から71残基目までのペプチド：Fmoc-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Ser(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。なお、C末端から69残基目のFmoc-Ser(tBu)、70残基目のFmoc-Trp(Boc)および71残基目のFmoc-Ser(tBu)を結合させる反応は、反応効率が良くないことが予測されていたため、デプロテクション溶液による反応をさらに3回繰り返し、ペプチドに結合しているFmoc基が十分にはずれるようにした後、アミノ酸を結合させる反応時間を120分間にして行なった。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、上記1)と同様の方法で合成産物の確認を行なった。

【0065】5) 上記4)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から81残基目までのペプチド：Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Ser(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂を合成した。

【0066】ここで、合成に使用されたアミノ酸誘導体は以下の通りである：Fmoc-Ala、Fmoc-Arg(Pmc)、Fmoc-Asn(Trt)、Fmoc-Asp(OtBu)、Fmoc-Cys(Trt)、Fmoc-Gln(Trt)、Fmoc-Glu(OtBu)、Fmoc-Gly、Fmoc-His(Trt)、Fmoc-Ile、Fmoc-Leu、Fmoc-Lys(Boc)、Fmoc-Met、Fmoc-Ph

e、Fmoc-Pro、Fmoc-Ser(tBu)、Fmoc-Thr(tBu)、Fmoc-Trp(Boc)、Fmoc-Tyr(tBu)、Fmoc-Val()内は残基部分の反応基を保護する保護基を表す；(株)パーキンエルマージャパンアプライドバイオシステムズ事業部製)。

【0067】上記のようにして得られた保護ペプチド樹脂にデプロテクション溶液を反応させてN末端のFmoc基を脱保護した。次に7mlのNMPにて6回洗浄後、ジクロロメタンにて3回洗浄し、さらにアルゴンガスを吹き付けることにより15分間乾燥させた。樹脂を取り出し、クリベージ溶液を30ml加え、室温で2時間反応させることにより、樹脂からのペプチドの切断およびアミノ酸鎖保護基の除去を行い、ペプチド溶液を得た。

【0068】このペプチド溶液をポリテトラフルオロエチレン(以下「PTFE」という)フィルター(3.0μm、アドバンテック東洋株式会社製)を用いて濾過し、濾液を遠心管に回収した。これをアスピレーターを用いて濃縮した後、80mlの冷エーテルを加えてペプチドを沈殿させた。しばらく冷却後、このものを遠心分離して(3000rpm、10分間)沈殿を回収し、再び冷エーテルを加えて分散させては回収する操作を3回繰り返すことにより沈殿を洗浄した。得られた沈殿を乾燥させ、粗ペプチド252mgを得た。

【0069】この粗ペプチド75mgを0.1%TFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、以下の条件で高速液体クロマトグラフィー(以下「HPLC」という)に供した：

カラム：ODSカラム(TSK-ゲル ODS-120T、粒径5μm、孔径120Å、カラムサイズφ21.5mm×300mm、東ソー(株)社製)

移動相：35-37% アセトニトリル/0.1% TFA、30分(直線濃度勾配)

流速：5ml/分

検出波長：220nm

23~25分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って、目的とするペプチド11.5mgを得た。

【0070】ここで得られたペプチドはまだ不純物を含んでいたため、さらに以下の条件でHPLC精製を行なった：

カラム：C22カラム(ドコシル-B、カラムサイズφ10mm×250mm、センシュー(株)社製)

移動相：30-31% アセトニトリル/0.1% TFA、30分(直線濃度勾配)

流速：1.5ml/分

検出波長：220nm

32~34分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って、目的とするペプチド2.5mgを得た。

【0071】この精製ペプチドについて、質量分析計を用いESI法にて分子量を確認した。さらにこのペプチ

ド100pmolについて、アミノ酸配列分析装置 (PPSQ-10型、島津製作所 (株) 社製) を用いて、N末端から10残基までのアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号1のうち、アミノ酸番号1から10に示されるアミノ酸配列と一致していることが確認された。

【0072】〔実施例2〕 ペプチド2

ペプチド2 (配列表の配列番号2) の合成は、合成状況を確認する目的、および合成機に試薬を追加する目的のために、以下に記載するように4段階に分けて行なった。

1) ペプチド2のC末端残基に相当するアミノ酸 (Glu) が導入されているFmoc-Glu(OtBu)-Wang樹脂の100μmol相当に、6mlの20%ピペリジンを加え30分室温で反応させることによりFmoc基を脱離した。樹脂を洗浄後、CAP液5mlを室温で30分間反応させた。この操作により、実施例1と同様、樹脂に導入されているC末端アミノ酸のα-アミノ基のうち、約80%がアセチル基でブロックされ、後のペプチド合成はブロックを免れたα-アミノ基からのみ進行するので、樹脂上に合成されるペプチドの最大数が減少する。

【0073】樹脂を洗浄後、反応ベッセルに移し、まず、C末端から21残基目までのペプチド：Fmoc-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を取り出し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0074】2) 上記1)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から41残基目までのペプチド：Fmoc-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を取り出し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0075】3) 上記2)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から61残基目までのペプチド：Fmoc-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-

-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を取り出し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0076】4) 上記3)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から79残基目までのペプチドを合成した。ただし、C末端から68残基目のFmoc-Trp(Boc)および69残基目のFmoc-Ser(tBu)を結合させる反応は、反応効率が良くないことが予測されたため、デプロテクション溶液による反応をさらに3回繰り返し、ペプチドに結合しているFmoc基が十分にはずれるようにした後、アミノ酸を結合させる反応時間を120分間に延ばして行なった。

【0077】以上の方法により、Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が得られた。このものに脱Fmoc反応、およびクリベージ反応を行って、粗ペプチド194mgを得た。

【0078】この粗ペプチドのうち97mgを0.1% TFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、以下の条件でHPLC精製を行った：

カラム：ODSカラム (TSK-ゲル ODS-120T)

移動相：35-38% アセトニトリル/0.1% TFA、30分 (直線濃度勾配)

流速：5ml/分

検出波長：220nm

27~28分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って、目的とするペプチド7mgを得た。

【0079】ここで得られたペプチドはまだ不純物を含んでいたため、さらに下記の条件でHPLC精製を行なった：

カラム：C22カラム (ドコシル-B)

移動相：31-32% アセトニトリル/0.1% TFA、30分 (直線濃度勾配)

流速：1.5ml/分

検出波長：220nm

20~22分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結

乾燥を行って、目的とするペプチド 2. 3 mg を得た。

【0080】この精製ペプチドについて、質量分析計を用いESI法にて分子量を確認した。また精製ペプチド 100 pmol について、N末端から10残基までのアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号2のうち、アミノ酸番号1から10に示されるアミノ酸配列と一致していることが確認された。

【0081】〔実施例3〕 ペプチド3

ペプチド3（配列表の配列番号3）の合成は、合成状況を確認する目的、および合成機に試薬を追加する目的のために、以下に記載するように5段階に分けて行なった。

1) まず、実施例1に記載した方法で、C末端から21残基目までのペプチド：Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0082】2) 上記1)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から41残基目までのペプチド：Fmoc-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0083】3) 上記2)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から51残基目までのペプチド：Fmoc-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0084】4) 上記3)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から61残基目までのペプチド：Fmoc-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr

(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0085】5) 上記4)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から79残基目までのペプチドを合成した。ただし、C末端から68残基目のFmoc-Trp(Boc)および69残基目のFmoc-Ser(tBu)を結合させる反応は、反応効率が良くないことが予測されたため、デプロテクション溶液による反応をさらに3回繰り返し、ペプチドに結合しているFmoc基が十分にはずれるようにした後、アミノ酸を結合させる反応時間を120分間に延ばして行なった。

【0086】以上の方法により、Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Cl-Trt樹脂が得られた。このものに脱Fmoc反応、およびクリベージ反応を行って、粗ペプチド380 mgを得た。このうち190 mgを、0.1% TFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、下記の条件でHPLC精製を実施した：

カラム：ODSカラム（TSK-ゲル ODS-120T）

移動相：35-37% アセトニトリル／0.1% TFA、30分（直線濃度勾配）

流速：5 ml / 分

検出波長：220 nm

25～27分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って、目的とするペプチド15.6 mgを得た。

【0087】この精製ペプチドについて、質量分析計を用いESI法にて分子量を確認した。また精製ペプチド 100 pmol について、N末端から10残基までのアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号3のうち、アミノ酸番号1から10に示されるアミノ酸配列と一致していることが確認された。

【0088】[実施例4] ペプチド4

ペプチド4 (配列表の配列番号4) の合成は、合成状況を確認する目的、および合成機に試薬を追加する目的のために、以下に記載するように5段階に分けて行なった。

1) まず、実施例2に記載した方法で、C末端から21残基目までのペプチド：Fmoc-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂を合成した時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0089】2) 上記1)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から41残基目までのペプチド：Fmoc-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0090】3) 上記2)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から61残基目までのペプチド：Fmoc-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0091】4) 上記3)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から81残基目までのペプチド：Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Ser(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr

(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。ただし、C末端から69残基目のFmoc-Ser(tBu)、70残基目のFmoc-Trp(Boc)および71残基目のFmoc-Ser(tBu)を結合させる反応は、反応効率が良くないことが予測されたため、デプロテクション溶液による反応をさらに3回繰り返し、ペプチドに結合しているFmoc基が十分にはずれるようにした後、アミノ酸を結合させる反応時間を120分間に延ばして行なった。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

5) 上記4)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から93残基目までのペプチドを合成した。

【0092】以上の方法により、Fmoc-Gln(Trt)-Phe-Ala-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Gly-Phe-Thr(tBu)-Leu-Met-Gly-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Ser(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が得られた。このものに脱Fmoc反応、およびクリベージ反応を行って、粗ペプチド47.4mgを得た。その全量を、0.1% TFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、下記の条件でHPLC精製を実施した：

カラム：ODSカラム (TSK-ゲル ODS-120T)

移動相：39-49% アセトニトリル/0.1% TFA、30分 (直線濃度勾配)

流速：5ml/分

検出波長：220nm

22~25分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って、目的とするペプチド4.4mgを得た。

【0093】この精製ペプチドについて、質量分析計を用いESI法にて分子量を確認した。また精製ペプチド100pmolについて、N末端から10残基までのアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号4のうち、アミノ酸番号1から10に示されるアミノ酸配列と一致していることが確認された。

【0094】[実施例5] ペプチド5

ペプチド5 (配列表の配列番号5) の合成は、合成状況

を確認する目的、および合成機に試薬を追加する目的のために、以下に記載するように4段階に分けて行なった。

1) まず、実施例2に記載した方法により、C末端から11残基目までのペプチド：Fmoc-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂を合成した時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0095】2) 上記1)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から31残基目までのペプチド：Fmoc-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0096】3) 上記2)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から54残基目までのペプチド：Fmoc-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0097】4) 上記3)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から95残基目までのペプチドを合成した。ただし、C末端から70残基目のFmoc-Ser(tBu)、71残基目のFmoc-Lys(Boc)、72残基目のFmoc-Trp(Boc)および73残基目のFmoc-Ser(tBu)を結合させる反応は、反応効率が良くないことが予測されたため、デプロテクション溶液による反応をさらに3回繰り返して、ペプチドに結合しているFmoc基が十分にはずれるようにした後、アミノ酸を結合させる反応時間を120分間に延ばして行なった。

【0098】以上の方法により、Fmoc-Gln(Trt)-Phe-Ala-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Gly-Phe-Thr(tBu)-Leu-Met-Gly-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Ser(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Asp(OtBu)-Ile-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を

c)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂を得た。このものに脱Fmoc反応、およびクリベージ反応を行って、粗ペプチド134mgを得た。その全量を、0.1% TFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、下記の条件でHPLC精製を実施した：

カラム：ODSカラム(TSK-ゲル ODS-120T)

移動相：38-50% アセトニトリル/0.1% TFA、30分(直線濃度勾配)

流速：5ml/分

検出波長：230nm

20~23分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って、目的とするペプチド14mgを得た。

【0099】この精製ペプチドについて、質量分析計を用いESI法にて分子量を確認した。また精製ペプチド100pmolについて、N末端から10残基までのアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号5のうち、アミノ酸番号1から10に示されるアミノ酸配列と一致していることが確認された。

【0100】[実施例6] ペプチド6

ペプチド6(配列表の配列番号6)の合成は、合成状況を確認する目的、および合成機に試薬を追加する目的のために、以下に記載するように5段階に分けて行なった。

1) まず、実施例2に記載した方法により、C末端から21残基目までのペプチド：Fmoc-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂を合成した時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0101】2) 上記1)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から54残基目までのペプチド：Fmoc-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後、合成を

中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0102】3) 上記2)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から74残基目までのペプチド：Fmoc-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Ser(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Asp(OtBu)-Ile-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、脱Fmoc反応後合成を中断した。ただし、C末端から70残基目のFmoc-Ser(tBu)、71残基目のFmoc-Lys(Boc)、72残基目のFmoc-Trp(Boc)および73残基目のFmoc-Ser(tBu)を結合させる反応は、反応効率が良くないことが予測されたため、デプロテクション溶液による反応をさらに3回繰り返し、ペプチドに結合しているFmoc基が完全にはずれるようにした後、アミノ酸を結合させる反応時間を120分間に延ばして行なった。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

【0103】4) 上記3)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から94残基目までのペプチド：Fmoc-Phe-Ala-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Gly-Phe-Thr(tBu)-Leu-Met-Gly-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Ser(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Asp(OtBu)-Ile-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂を合成した時点で、脱Fmoc反応後、合成を中断した。一部樹脂を採取し、クリベージ反応を行って、実施例1の1)に記載した方法で合成産物の確認を行った。

5) 上記4)の残りの樹脂を用いて引き続きペプチド合成を行い、C末端から99残基目までのペプチドを合成した。

【0104】以上の方法により、Fmoc-Gly-Asp(OtBu)-Pro-Arg-Gln(Trt)-Phe-Ala-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Gly-Phe-Thr(tBu)-Leu-Met-Gly-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Ser(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Asp(OtBu)-Ile-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂を得た。このものに脱Fmoc反応、およびクリベージ反応を行って、粗ペプチド706mgを得た。このうち43mgを、0.1% TFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、下記の条件でHPLC精製を実施した：

カラム：C22カラム(ドコシル-B)
移動相：32-36% アセトニトリル/0.1% TFA、30分(直線濃度勾配)
流速：1.5ml/分
検出波長：230nm
23~25分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って目的とするペプチド3.2mgを得た。

【0105】この精製ペプチドについて、質量分析計を用いESI法にて分子量を確認した。また精製ペプチド100pmolについて、N末端から10残基までのアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号6のうち、アミノ酸番号1から10に示されるアミノ酸配列と一致していることが確認された。

【0106】[実施例7] ペプチド7

ペプチド7(配列表の配列番号7)は、マルチペプチドシンセサイザー(シンフォニー、プロテインテクノロジ社製)を用い、Fmoc固相合成法にて同装置のプロトコールに従って合成された。

【0107】すなわち、合成するペプチドのC末端残基に相当するアミノ酸(Lys)が導入されているFmoc-Lys(Boc)-Wang樹脂(0.50mmol/g)の25μmol相当を上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、デプロテクション溶液(20%ピペリジン/ジメチルホルムアミド)1.25mlを加えて5分間2回反応させ、樹脂に結合しているアミノ酸のFmoc基を除いた。樹脂をジメチルホルムアミド液1.25mlで30秒間6回洗浄し、C末端側から2番目のアミノ酸の誘導体Fmoc-Trp(Boc)の100mM溶液(溶媒はジメチルホルムアミド)1.25mlに、マルチペプチドシンセサイザー用アクチベーター溶液(100mM 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート/400mM N-メチルモルフォリン/ジメチルホルムアミド)1.25mlを加え(結合アミノ酸に対して5倍

等量)、20分間室温で反応させた。ここで生成したFmoc-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Wang樹脂をジメチルホルムアミド1.25mlで30秒間6回洗浄後、再びFmoc基の除去を行い、ジメチルホルムアミド1.25mlで30秒間6回洗浄後、Fmoc-Ser(tBu)溶液とマルチペプチドシンセサイザー用アクチベーター溶液を加え反応させた。同様の操作を繰り返すことにより保護ペプチド樹脂:Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Wang樹脂を合成した。

【0108】ペプチド7およびペプチド8(配列表の配列番号8)の合成に使用したアミノ酸誘導体は以下の通りである:Fmoc-Ala、Fmoc-Asn(Trt)、Fmoc-Asp(OtBu)、Fmoc-Cys(Trt)、Fmoc-Gln(Trt)、Fmoc-Glu(OtBu)、Fmoc-Gly、Fmoc-His(Trt)、Fmoc-Ile、Fmoc-Leu、Fmoc-Lys(Boc)、Fmoc-Met、Fmoc-Phe、Fmoc-Pro、Fmoc-Ser(tBu)、Fmoc-Thr(tBu)、Fmoc-Trp(Boc)、Fmoc-Tyr(tBu)、Fmoc-Val()内は残基部分の反応基を保護する保護基を表す。;(株)パーキンエルマー・ジャパンアプライドバイオシステムズ事業部製)。

【0109】上記のように合成し得られた保護ペプチド樹脂にデプロテクション溶液1.25mlを5分間2回反応させてN末端のFmoc基を脱保護した。次に樹脂を1.25mlのジメチルホルムアミドにて6回洗浄後、ジクロロメタンにて9回洗浄し、さらに窒素ガスを吹き付けることにより20分間乾燥させた。樹脂を回収し、クリベージ溶液(TFA:エタンジチオール:水:トリイソプロピルシラン=92.5:2.5:2.5:2.5(体積比))を2ml加え、室温で2時間反応させることにより樹脂からのペプチドの切断およびアミノ酸側鎖保護基の除去を行い、ペプチド溶液を得た。このペプチド溶液をPTFEフィルターを用いて濾過し、濾液を遠心管に回収した。この濾液に10mlの冷エーテルを加え、ペプチドを沈殿させた。しばらく冷却後、これを遠心して(3000rpm、10分間)沈殿を回収し、再び冷エーテルを加えて分散させては回収する操作を4回繰り返してペプチド洗浄した。得られたペプチドを乾燥させ、粗ペプチドを得た。

【0110】得られた粗ペプチドのうち7.0mgを、0.1% TFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、下記の条件でHPLC精製を実施した:
カラム:C22カラム(ドコシル-B)
移動相:20-25% アセトニトリル/0.1% TFA、20分(直線濃度勾配)
流速:7ml/分
検出波長:220nm

16~17分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って、目的とするペプチド2.0mgを得た。この精製ペプチド100pmolについて、アミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号7に示される

アミノ酸配列が確認された。

【0111】[実施例8] ペプチド8

実施例7と同様の操作により、保護ペプチド樹脂:Fmoc-Asp(OtBu)-Ile-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Wang樹脂を合成し、脱保護およびクリベージ反応を行なって、粗ペプチドを得た。

【0112】得られた粗ペプチドのうち3.1mgを、0.1% TFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、下記の条件でHPLC精製を実施した:
カラム:ODSカラム(TSKゲル ODS-120T)

移動相:22-27% アセトニトリル/0.1% TFA、20分(直線濃度勾配)

流速:2ml/分

検出波長:220nm

14~15.5分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って、目的とするペプチド0.9mgを得た。この精製ペプチド100pmolについて、アミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0113】[実施例9] ペプチド9

1) 基本単位をコードするDNAの合成

ペプチド9(配列表の配列番号10のアミノ酸番号1から185)は、スギ花粉アレルゲンの6種のT細胞エпитープを

A-E-C-D-F-G

のように連結したもの(以下「H6-1」という。配列表の配列番号31)と、下記のアミノ酸配列を有するリンカーペプチド:

Thr-Met-Ile-Thr-Asn-Ser-Ser-Ser-Val-Pro-Gly-Asp-Pro-Arg

(L1、配列表の配列番号26);

Arg-Ala-Asp-Pro-Arg (L2、配列表の配列番号27);

およびArg-Ala-Asp-Leu (L3、配列表の配列番号80)とが、

(L1)-(H6-1)-(L2)-(H6-1)-(L3)

のように連結された構造を有する。ペプチド9を遺伝子組換え技術を利用して大腸菌に生産させるにあたっては、以下に詳述するように、まずH6-1をコードするDNA(以下「h6-1」という)を調製し、次いでH6-1をコードするDNAを含む領域を重合させることによりペプチド9をコードするDNAを含む大腸菌用発現プラスミドベクターを構築し、該プラスミドベクターで大腸菌を形質転換する方法を用いた。

【0114】h6-1の設計にあたっては、大腸菌のコドン使用頻度[Crantham, R. et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 43]を考慮し、また、後にh6-1を重合せしめるために必要な制限酵素認識配列が、コーディ

ング領域の5'末端側 (BamHI) および3'末端側 (BglII) にそれぞれ付加されるようにした。3'末端側BglII認識配列のさらに3'末端側には、発現プラスミドへの挿入を考慮し、制限酵素SalI認識配列を付加した (配列表の配列番号30)。

【0115】まず、制限酵素認識配列が付加されたh6-1のセンス鎖またはアンチセンス鎖の部分配列である下記のオリゴヌクレオチド:

5'- gatccgcgtg gtatcatcgc agcataccag aacccggcat ct tgg -3' (F1、配列表の配列番号32);

5'- catagaccaa gatgccgggt tctggtatgc tgcgatgata cc acgcg -3' (F2、配列表の配列番号33);

5'- tctatgaaag ttaccgttgc tttaaccag ttcggtccg -3' (F3、配列表の配列番号34);

5'- tgcgaacgga ccgaactggt tgaagcaac ggtaacttt -3' (F4、配列表の配列番号35);

5'- ttgcaccta aaaacttcca tctgcagaaa -3' (F5、配列表の配列番号36);

5'- ggtgtttttc tgcagatgga agttttttaga -3' (F6、配列表の配列番号37);

5'- aacaccaaac tgacctctgg taaaatcgca tcttgc -3' (F7、配列表の配列番号38);

5'- gttcaggcaa gatgcgattt taccagaggt cagttt -3' (F8、配列表の配列番号39);

5'- ctgaactacg gtctgtttca tgttgcacaa aacaactacg a -3' (F9、配列表の配列番号40);

5'- gacgggtcgt agttgttgtt tgcaaatga accagaccgt a -3' (F10、配列表の配列番号41);

5'- cccgtctggt aaatacgaag gtggtaacat ctacacaaa a -3' (F11、配列表の配列番号42);

5'- ctctcttttt ggtgtatag ttaccacctt cgtatttacc a -3' (F12、配列表の配列番号43);

5'- aagaagcatt caacgttgaa cgtgcagatc tgtaag -3' (F13、配列表の配列番号44); および

5'- tcgacttaca gatctgcacg ttcaacgttg aatg -3' (F

オリゴヌクレオチド (F2~F13)

5~10 μ l

10倍濃度 リン酸転移反応用緩衝液

(T4 ポリヌクレオチド・キナーゼ (宝酒造 (株) 社製に添付) 5 μ l

10mM アデノシン三リン酸 (以下「ATP」という) 5 μ l

T4 ポリヌクレオチド・キナーゼ (宝酒造 (株) 社製) 10単位

滅菌蒸留水で50 μ lとした。

温度条件: 37℃で1時間保温後、70℃で5分間保温して酵素を失活させてリン酸化反応を止めた。

【0118】反応終了後の各反応液に、3M 酢酸ナトリウム溶液を1/10容添加し、冷エタノールを2.5容加えた後、10000 \times g、4℃で15分間遠心分離

オリゴヌクレオチド断片

(F1、F2p~F13p、F14)

各2.5~5 μ l

1M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5)

10 μ l

1M 塩化マグネシウム溶液

1 μ l

14、配列表の配列番号45)

を、DNA合成機 (モデル394; アプライド・バイオシステムズ社製) にて合成した。これらは、F1とF2、F3とF4、F5とF6、F7とF8、F9とF10、F11とF12、F13とF14、という組み合わせで、それぞれ5'末端側から7個めのヌクレオチドから3'末端側のヌクレオチド配列が相補的であり、またF3とF2、F5とF4、F7とF6、F9とF8、F11とF10、F13とF12の組み合わせでは、5'末端側の6個のヌクレオチド配列がそれぞれ相補的である。したがって、まずF1とF2、F3とF4、F5とF6、F7とF8、F9とF10、F11とF12、F13とF14、という組み合わせで、それぞれ相補鎖をアニーリングさせて、二本鎖DNAを形成した後に、各二本鎖DNAに生じた5'突出末端の相補鎖を利用して各断片を連結することにより、h6-1を作製することができる。

【0116】合成した各オリゴヌクレオチドは、窒素を吹き込んでアンモニアを除去し、乾燥させた後、滅菌蒸留水に溶解し、その10~30 μ gを採取して、それぞれ7M尿素を含む8% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。各オリゴヌクレオチドを含むバンド部分のゲルを切り出し、溶出緩衝液 (0.5M 酢酸アンモニウム、10mM 酢酸マグネシウム) を加えて、振とうしながら37℃で16時間保温してオリゴヌクレオチドを溶出させた。この溶出液に2.5倍容の冷エタノールを加えてオリゴヌクレオチドを沈殿させ、10000 \times g、4℃で15分間遠心分離して回収した。沈殿を70%エタノールで洗浄後、20 μ lの滅菌蒸留水に溶解して、精製オリゴヌクレオチドとした。

【0117】次に、F1とF14を除く、F2~F13のオリゴヌクレオチドの5'末端をそれぞれリン酸化した (以下「F2p」~「F13p」という)。反応液組成は以下に記載する通りであった:

して、F2p~F13pを沈殿として回収した (以下、この操作を「エタノール沈殿」という)。70%エタノールで洗浄後、5 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。

【0119】次いで、F2p~F13pと、F1およびF14を一つのチューブにまとめ、アニーリングを行った。反応液組成は以下に記載する通りであった:

蒸留滅菌水で全量を100 μ lとした。

温度条件：サーマルサイクラー（モデル9600；パーキン・エルマー社製）を使用して、95℃で5分間加熱後、90分間で95℃から25℃へ冷却した。

【0120】反応終了後、エタノール沈殿を行なって沈殿を回収し、1mM エチレンジアミン四酢酸（以下「EDTA」という）を含む10mM トリス塩酸緩衝液（pH8.0：以下「TE緩衝液」という）10 μ lに溶解した。アニーリングさせたオリゴヌクレオチド混合液3 μ lを、DNAライゲーション・キット（宝酒造（株）社製）で、キットに添付された説明書に記載の方法に従い、16℃で16時間保温して連結させた。連結反応終了後、エタノール沈殿を行なって沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後、6 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。

【0121】一方、クローニングベクターpUC18（宝酒造（株）社製）を制限酵素BamHIおよびSalIで順次消化してから、エタノール沈殿を行なって沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後、TE緩衝液に溶解した。このものについて0.8%低融点アガロースゲル（FMCバイオプロダクツ社製）電気泳動を行った。電気泳動後、当業者に周知の方法によりゲル中のDNAを可視化して、約2.7kbpに相当するバンド部分のゲルを切り出し、アガロースの終濃度が0.5%以

L培地

バクト・トリプトン（ディフコ社製）	10 g
バクト・イーストエクストラクト（ディフコ社製）	5 g
塩化ナトリウム	5 g
イオン交換水で全量を1リットルとした。	

【0123】

L-ブロス寒天培地

バクト・トリプトン	10 g
バクト・イーストエクストラクト	5 g
塩化ナトリウム	5 g
バクト・アガー（ディフコ社製）	15 g
イオン交換水で全量を1リットルとした。	

【0124】

2×TY培地

バクト・トリプトン	16 g
バクト・イーストエクストラクト	10 g
塩化ナトリウム	5 g
イオン交換水で全量を1リットルとした。	

【0125】

SOC培地

バクト・トリプトン	20 g
バクト・イーストエクストラクト	5 g
5M 塩化ナトリウム溶液	2 ml
2M 塩化カリウム溶液	1.25 ml
1M 塩化マグネシウム溶液	10 ml
1M 硫酸マグネシウム溶液	10 ml

下になるように等容のTE緩衝液（pH8.0）を加えて、65℃で5分間保温してゲル片を溶かした。これを等容のフェノール溶液（飽和フェノールに8-キノリノールを終濃度で0.1%となるように加えたもの）で2回、フェノール・クロロホルム溶液（フェノール溶液、クロロホルム、およびイソアミルアルコールを50対49対1に混合したもの）で1回、クロロホルム溶液（クロロホルムとイソアミルアルコールを49対1に混合したもの）で1回抽出した。さらにエタノール沈殿を行なって沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後、滅菌蒸留水10 μ lに溶解した。このBamHI-SalI消化したpUC18溶液1 μ lに、上記のF1-F14を連結した断片を2 μ l加えて、DNAライゲーション・キットを用いて連結した。

【0122】このライゲーション反応液を、ハナハン法 [Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580 参照] により調製されたコンピテント大腸菌JM109株（宝酒造（株）社製）100 μ lに加え、30分間氷冷した。42℃で45秒間保温してから、直ちに3分間氷冷した。これに900 μ lのSOC培地を加え、37℃で1時間振とう培養した。この培養液を、50 μ g/mlアンピシリンを含むL-ブロス寒天培地プレート上に塗り広げ、37℃で一晩培養した。ここで使用された培地の組成は以下に記載する通りである：

2M ブドウ糖溶液

10ml

イオン交換水で全量を1リットルとした。

【0126】上記の培養条件で出現したアンピシリン耐性コロニーを単離して、L-ブロス培地に接種し、37℃で一晩振とう培養した。培養液3mlから、キアゲン・プラスミド・ミニ・キット（キアゲン社製）をキットに添付された説明書に記載の方法に従って使用し、h6-1を含むクローニングベクターpUC18（以下「pUC(h6-1)」という）を抽出した（図1）（なお、以下に記載する実施例中のすべてのプラスミド抽出には、上記キットを使用した）。キットにより抽出されたプラスミドは、エタノール沈殿後、70%エタノール洗浄して滅菌蒸留水50μlに溶解した。

【0127】このようにして得られたpUC(h6-1)に挿入されたDNAのヌクレオチド配列を、DNAシーケンサー（310ジェネティック・アナライザー、アプライド・バイオシステムズ社製）を用いて調べた結果、クローニングされたh6-1は、当初設計されたヌクレオチド配列（配列表の配列番号30）のヌクレオチド番号247のcがtに置換されていたが、その箇所にコードされるアミノ酸Asn（配列表の配列番号31のアミノ酸番号79）のコードには変化を与えなかったため、そのまま以下の実施例に使用した。置換後のh6-1のヌクレオチド配列、および該配列にコードされるアミノ酸配列を、それぞれ配列表の配列番号24（ヌクレオチド番号11から253）および配列番号25（アミノ酸番号4から84）に示した。

【0128】2）ペプチド9発現プラスミドの構築
図1に、スギアレルゲン・エпитープ6連結ペプチドH6-1重合タンパク質発現プラスミドの構築の概略を示す。上記1）で得られたpUC(h6-1)を制限酵素BamHIとSalIで消化し、小断片（約270bp相当）を2.5%低融点アガロースゲル（FMCバイオプロダクツ社製）を用いた電気泳動で精製した。またこ

SOB培地：

バクト・トリプトン	20g
バクト・イーストエクストラクト	5g
5M 塩化ナトリウム溶液	2ml
2M 塩化カリウム溶液	1.25ml
1M 塩化マグネシウム溶液	10ml
1M 硫酸マグネシウム溶液	10ml

イオン交換水で全量を1リットルとした。

【0130】

形質転換緩衝液（TB）：

PIPES（ナカライテスク社製）	3.0g
塩化カルシウム・2水和物	2.2g
塩化カリウム	18.6g
塩化マンガン・4水和物	10.9g
蒸留水で全量を1リットルとし、5N 水酸化カリウム溶液でpHを6.7	

～6.8に調整した。

れとは別にpUC(h6-1)をBglIIとSalIで消化し、大断片（約2.9kbp相当）を1%低融点アガロースゲル（FMCバイオプロダクツ社製）電気泳動で精製した。次に、pUC(h6-1)のBglII-SalI消化大断片に、pUC(h6-1)のBamHI-SalI消化小断片をDNAライゲーション・キットを用いて連結することにより、プラスミドpUC(h6-1)₂を得た。BamHI消化またはBglII消化によって生じる突出末端は同一であるので、BamHI消化断片とBglII消化断片とは連結可能であるが、その連結後のヌクレオチド配列はBamHIまたはBglIIによって再切断されない。

【0129】3）大腸菌での発現

大腸菌YA21株（JM109株でも可）をL-ブロス寒天培地プレート上に塗り広げ、37℃で一晩培養した。形成した単コロニーを250mlのSOB培地の入った3リットル三角フラスコに植菌し、18℃、200rpmで振とう培養した。45時間後、培養液の660nmにおける吸光度（OD_{660nm}）が1.19に達したところで、フラスコを氷水中につけて10分間冷却した。この培養液を4℃で1200×g、15分間遠心分離して、沈殿した菌体を回収した。この菌体を80mlの氷冷形質転換緩衝液（以下「TB」という）に懸濁して、10分間氷冷後、4℃で1200×g、15分間遠心分離して、沈殿した菌体を回収した。菌体を20mlの氷冷TBに再懸濁し、ジメチルスルホキシド（以下「DMSO」という）を1.5ml（終濃度7%）加えて、さらに10分間氷冷した。このものをドライアイス-エタノール浴中で0.5mlずつチューブに分注し、直ちに凍結し、コンピテント大腸菌試料として-80℃に保存した。ここで使用された緩衝液と培地の組成は、以下に記載する通りであった：

【0131】上記2)で構築されたプラスミドpUC(h6-1)₂は、pUC18のlacプロモーター支配下のlacZ遺伝子と、ペプチド9をコードするDNAとが同一リーディングフレーム上に連結されているので、これらのプラスミドを宿主に導入することにより、ペプチド9の発現が可能である(図2)。

【0132】60ngのpUC(h6-1)₂を、上記のように調製されたコンピテント大腸菌100μlに加え、30分間氷冷した後、42℃で45秒間保温してから直ちに3分間氷冷した。これに900μlのSOC培地を加え、37℃で1時間振とう培養した。この培養液を、50μg/mlのアンピシリンを含むL-ブロス寒天培地プレート上に塗り広げ、37℃で一晩培養した。出現したアンピシリン耐性コロニーを、50μg/mlのアンピシリンを含む2×TY培地2mlにて、37℃で振とう培養を行った。8時間後、培養液のOD_{660nm}が1~3に達したところで、その培養液の一部を最終OD_{660nm}が0.01になるように、100μg/mlのアンピシリンを含む2×TY培地100mlに移し、37℃で14時間振とう培養を行った。培養終了

TES緩衝液(pH7.6):

1M トリシュー塩酸緩衝液(pH7.6)	10ml
5M 塩化ナトリウム溶液	30ml
0.5M EDTA溶液	20ml
蒸留水で全量を1リットルとする。	

【0134】

リン酸緩衝液(1%トリトンX-100含有):

塩化ナトリウム	8g
塩化カリウム	0.2g
リン酸水素二ナトリウム・12水和物	2.9g
リン酸二水素カリウム	0.2g
トライトンX-100(シグマ社製)	10g
蒸留水で全量を1リットルとした。	

【0135】

6M グアニジン塩酸溶液(pH7.6):

グアニジン塩酸塩	57.32g
1M トリシュー塩酸緩衝液(pH7.6)	5ml
1M ジチオスレイトール(以下「DTT」という)溶液	1ml
蒸留水で全量を100mlとした。	

【0136】上記ペプチド9の粗精製液75μlについて、下記の条件でHPLC精製を行った:

カラム: ODSカラム(TSK-ゲルODS-120T、φ7.8mm×300mm、東ソー(株)社製)
移動相: 20% アセトニトリル/0.1% TFA(0-5分)、20-70% アセトニトリル(5-35分)/0.1% TFA(直線濃度勾配)
流速: 2ml/分
検出波長: 220nm
溶出時間24.3分付近のピークを分取し、得られた物質について、N末端から25残基までのアミノ酸配列分

析を行った結果、配列表の配列番号10のアミノ酸番号1から25に示されるアミノ酸配列と一致した。なお、h6-1にコードされるアミノ酸配列のN末端のメチオニン残基は、精製までの過程で失われていた。また、得られた物質について、ESI法で分子量を測定した結果、ペプチド9のアミノ酸構成から予測される分子量と一致した。以上のようにして、培養液100mlあたり4.1mgのペプチド9を得た。

【0133】培養終了後、90mlの培養液をとって、6000×g、4℃、20分の遠心分離を行なって沈殿する菌体を回収した。菌体を4.5mlのTES緩衝液に懸濁してから、超音波ホモジナイザー(ソニファイアー250、ブランソン社製)を用いて菌体を破碎した後、13000×g、4℃で20分間遠心分離して、封入体を沈殿として得た。この沈殿画分には、まだ菌体断片が多量に含まれているので、1%トリトンX-100を含むリン酸緩衝液4.5mlに懸濁し、室温で30分間振とうした後、25000×g、4℃で20分間遠心分離して、沈殿を回収した。この操作を4回繰り返した後、沈殿画分を9mlの蒸留水で2回洗浄した。沈殿画分の半量に、4.5mlの6M グアニジン塩酸溶液(pH7.6)を加え、37℃で1時間振とうして沈殿を可溶化し、25000×g、4℃で20分間遠心分離後、上清を回収してペプチド9の粗精製液とした。ここで使用された緩衝液の組成は以下に記載する通りであった:

【0137】[実施例10] ペプチド10
1) 基本単位をコードするDNAの合成
ペプチド10(配列表の配列番号12のアミノ酸番号1

から209)は、スギ花粉アレルゲンの7種のT細胞エпитープを

A-E-C-D-F-G-B

のように連結したもの(以下「H7-1」という。配列表の配列番号29)と、実施例9で記載したリンカーペプチドL1、L2およびL3とが、

(L1)-(H7-1)-(L2)-(H7-1)-(L3)

のように連結された構造を有する。ペプチド10を遺伝子組換え技術を利用して大腸菌に生産させるにあたっては、以下に詳述するように、まずH7-1をコードするDNA(以下「h7-1」という)を調製し、次いでh7-1をコードするDNAを含む領域を重合させることによりペプチド10をコードするDNAを含む大腸菌用発現プラスミドベクターを構築し、該プラスミドベクターで大腸菌を形質転換する方法を用いた。

【0138】h7-1の設計にあたっては、大腸菌のコドン使用頻度[Crantham, R. et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 43]を考慮し、また、後にh7-1を重合せしめるために必要な制限酵素認識配列が、コーディング領域の5'末端側(BamHI)および3'末端側(BglII)にそれぞれ付加されるようにした。3'末端側BglII認識配列のさらに3'末端側には、発現プラスミドへの挿入を考慮し、制限酵素SalI認識配列を付加した(配列表の配列番号28)。

【0139】まず、制限酵素認識配列が付加されたh7-1のセンス鎖またはアンチセンス鎖の部分配列として、実施例9で合成したF1~F12に加え、さらに下記のオリゴヌクレオチド:

鋳型DNA: 連結後の合成断片

10倍濃度 Ex Taq PCR緩衝液	2 μ l
(Ex Taq ポリメラーゼ(宝酒造(株)社製)に添付)	10 μ l
dNTP混合液(Ex Taq ポリメラーゼに添付)	8 μ l
20 pmol/ μ l プライマーPRv	2.5 μ l
20 pmol/ μ l プライマーPFw	2.5 μ l
Ex Taq ポリメラーゼ(宝酒造(株)社製)	2.5単位

滅菌蒸留水で全量を100 μ lとした(dNTP混合液はdATP、dCTP、dGTPおよびdTTPの等モル混合物を表す。以下の記載について同じ)。

温度条件: 94℃で3分間加熱処理した後、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分のサイクルを30回繰り返した後、72℃で10分間保温した(以下に記載する実施例中のすべてのPCRの反応温度調節は、サーマルサイクラー・モデル9600; パーキン・エルマー社製を使用した)。

【0142】反応終了後、10M 酢酸アンモニウム溶液を50 μ l、イソプロパノールを150 μ l加えてDNAを沈殿させ、遠心分離を行って回収した(以下この操作を「イソプロパノール沈殿」という)後、70%エタノールで洗浄して、滅菌蒸留水20 μ lに溶解した。

5'-aagaagcatt caacgttgaa cagttcgcta aactg -3' (F15、配列表の配列番号46);

5'-accggtcagt ttagegaact gttcaacgtt gaatg -3' (F16、配列表の配列番号47);

5'-accggtttca ccctgatggg tcgtgcagat ctgtaag -3' (F17、配列表の配列番号48); および

5'-tcgacttaca gatctgcacg acccatcagg gtgaa -3' (F18、配列表の配列番号49)

をDNA合成機にて合成し、実施例9の1)に記載した方法で精製した。さらに、F15、F16およびF17を実施例9の1)に記載した方法で5'末端をリン酸化した(以下「F15p」、「F16p」および「F17p」という)。

【0140】次に、オリゴヌクレオチドF1、F18および5'末端をリン酸化したF2p~F12p、F15p~F17pの各2.5 μ lを、実施例9の1)記載の組成および温度条件でアニーリングさせ、エタノール沈殿後、TE緩衝液10 μ lに溶解した。その3 μ lを、DNAライゲーションキットを用いて連結し、エタノール沈殿後、TE緩衝液5 μ lに溶解した。一方、この連結した断片を鋳型としてPCRを行うため、プライマーとして下記のオリゴヌクレオチド:

5'-ggatccgcgt ggtatcatcg ca -3' (PRv、配列表の配列番号50); および

5'-aggtcgactt acagatctgc ac -3' (PFw、配列表の配列番号51)

を合成した。

【0141】次いで、以下に記載する反応液組成および条件でPCRを実施した:

このもの(2 μ l)を制限酵素BamHIで消化し、さらにSalIで消化した後、エタノール沈殿を行って沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後、4 μ lのTE緩衝液に溶解した。このBamHI-SalI消化したDNA断片溶液(2 μ l)と、実施例9の1)で調製したBamHI-SalI消化したpUC18ベクター溶液(1 μ l)とを、DNAライゲーション・キットを使用して連結した。このライゲーション反応液で、実施例9の1)に記載した方法でコンピテント大腸菌JM109株を形質転換し、37℃で培養した。出現したアンピシリン耐性コロニーを単離して、L-ブロス培地に接種し、37℃で一晩振とう培養した。この培養液3mlから、h7-1を含むプラスミドpUC(h7-1)を抽出した(図1)。抽出されたプラスミドを、エタノール

沈殿し、70%エタノール洗浄後、滅菌蒸留水50 μ lに溶解した。pUC(h7-1)に挿入されたh7-1のヌクレオチド配列を調べた結果、H7-1(配列表の配列番号29)をコードするヌクレオチド配列(配列表の配列番号28)であることが確認された。

【0143】2) ペプチド10をコードする発現プラスミドの構築

図1に、スギ・アレルゲンエпитープ7連結ペプチドH7-1重合タンパク質発現プラスミドの構築の概略を示す。上記1)で調製されたpUC(h7-1)を制限酵素BamHIとSalIで消化し、2.5%低融点アガロースゲルを用いた電気泳動で小断片(約300bp)を精製した。一方、これとは別にpUC(h7-1)を制限酵素BglIIとSalIで消化し、1.0%低融点アガロースゲル電気泳動で大断片(約3.0kbp)を精製した。次に、これら断片をDNAライゲーションキットを用いて連結することにより、ペプチド10をコードするDNA(配列表の配列番号11)が挿入されたプラスミドpUC(h7-1)₂を得た。

【0144】3) 大腸菌での発現

実施例9の3)と同様にして、10ngのpUC(h7-1)₂で、コンピテント大腸菌YA21株(JM109株でも可能)を形質転換した。この形質転換株を、50 μ g/mlのアンピシリンを含むL-ブロス培地5ml中で、37℃で振とう培養した。9時間後、培養液のOD_{660nm}が3以上に達したところで、この培養液の一部を、最終OD_{660nm}が0.01になるように、100 μ l/mlのアンピシリンを含む1リットルの2×TY培地に植菌し、37℃で14時間振とう培養を行った。培養終了時、重合タンパク質はYA21株の菌体内で封入体を形成していた。この培養液90mlをとって、6000×g、4℃で20分間の遠心分離して沈殿する菌体を回収した。菌体を9mlのTES緩衝液に懸濁して、超音波ホモジナイザーで破碎後、13000×g、4℃で20分間遠心分離して封入体を沈殿として得た。沈殿を、1%トリトン含有リン酸緩衝液9mlで4回洗浄した。沈殿の半分量を、2M尿素緩衝液(2M尿素、50mMトリス-塩酸(pH7.6)、10mM DTT)4.5mlで2回、蒸留水4.5mlで2回洗浄して、6Mグアニジン塩酸溶液4.5mlで可溶化し、25000×g、4℃で20分間の遠心分離後、上清をペプチド10の粗精製液とした。この粗精製液1mlについて、下記の条件でHPLC精製を行った：

カラム：C18カラム(カプセルパックC18 SG300、 ϕ 10mm×250mm、(株)資生堂製)

移動相：37-42%アセトニトリル/0.1%TFA、30分(直線濃度勾配)

流速：3ml/分

検出波長：220nm

溶出時間13.9分付近のピークを分取して、得られた

物質について、N末端から38残基までのアミノ酸配列分析を行った結果、配列表の配列番号12のアミノ酸番号1から38に示されるアミノ酸配列と一致した。なお、h7-1にコードされるアミノ酸配列のN末端のメチオニン残基は、精製までの過程で失われていた。また、得られた物質について、ESI法で分子量を測定した結果、ペプチド10のアミノ酸構成から予測される分子量と一致した。以上のようにして、培養液1リットルあたり、27mgのペプチド10を得た。

【0145】[実施例11] ペプチド11および12

1) 基本単位をコードするDNAの合成
ペプチド12(配列表の配列番号15のアミノ酸番号1から95に示されるアミノ酸配列からなるペプチド)は、スギ花粉アレルゲンの7種のT細胞エпитープをA'-E-C'-D-F-G-B

のように連結した構造を有し、ペプチド11(配列表の配列番号13)はペプチド12のC末端にArgが付加された構造を有する。これらのペプチドを遺伝子組換え技術を利用して大腸菌に生産させるため、以下に記載するように、まずペプチド12をコードするDNA(以下「h7-3」という)を調製した。h7-3の設計にあたっては、大腸菌のコドン使用頻度を考慮し、また、後にh7-3を重合せしめるために必要な制限酵素認識配列が、コーディング領域の5'末端側(BamHI)および3'末端側(BglII)にそれぞれ付加されるようにした。3'末端側BglII認識配列のさらに3'末端側には、発現プラスミドへの挿入を考慮し、制限酵素SalI認識配列を付加した(配列表の配列番号52)。

【0146】まず、制限酵素認識配列が付加されたh7-3のセンス鎖またはアンチセンス鎖の部分配列として、実施例9および実施例10で合成したF1、F8～F12およびF15～F18に加え、さらに下記のオリゴヌクレオチド：

5'-aaatctatga aggtaccgt tgccttcaac cagttcggtc cg-3'(F19、配列表の配列番号54)；

5'-agattttccaa gatgccgggt tctggatgc tgcgatgata ccacgcg-3'(F20、配列表の配列番号55)；

5'-gacatcttcg catctaaaaa ctccatctg ca-3'(F21、配列表の配列番号56)；

5'-gatgtccgga ccgaactggt tgaagcaac ggtaactttc at-3'(F22、配列表の配列番号57)；

5'-gaaaaacaaa ctgacctctg gtaaatcgc atcttgc-3'(F23、配列表の配列番号58)；

5'-gtttttctgc agatggaagt tttagatgc gaa-3'(F24、配列表の配列番号59)；

を合成し、実施例9の1)に記載した方法で精製した。さらに、50pmol相当のF19～F24を実施例9の1)に記載した方法で5'末端をリン酸化した(以下「F19p」、「F20p」、「F21p」、「F22

p」、「F23p」および「F24p」という)。

【0147】次に、オリゴヌクレオチドF1、F18および5'末端をリン酸化したF8p~F12p、F15p~F17pおよびF19p~F24pを各10pmolずつ(1~2μl)混合し、実施例9の1)記載の組成および温度条件でアニリングさせ、エタノール沈殿後、TE緩衝液10μlに溶解した。その5μlを、DNAライゲーションキットを用いて連結し、エタノール沈殿後、滅菌蒸留水10μlに溶解した。

【0148】さらに、連結したDNA断片の溶液5μlを鋳型として、実施例10で調製したプライマーPRvとPFwを用い、実施例10の1)記載の反応液組成と温度条件でPCRを実施した。PCR後の反応液についてイソプロパノール沈殿を行った後、沈殿を回収して2.5%低融点アガロースゲル電気泳動を行った。増幅されたDNA断片に相当するバンド部分のゲルを切り出し、4倍容のTE緩衝液を加えて、65℃で5分間保温してゲルを溶解させた。このものを等容のフェノール溶液で2回、フェノール・クロロホルム溶液で1回、クロロホルム溶液で1回抽出した後、エタノール沈殿を行い、沈殿を70%エタノールで洗浄後、滅菌蒸留水10μlに溶解した。このもの(4μl)を制限酵素BamHIで消化し、さらにSalIで消化したDNA断片と、実施例9の1)で調製したBamHI-SalI消化したpUC18ベクターとを、DNAライゲーション・キットを使用して連結した。このライゲーション反応液で、実施例9の1)に記載した方法でコンピテント大腸菌JM109株を形質転換し、37℃で培養した。出現したアンピシリン耐性コロニーを単離して、L-プロス培地に接種し、37℃で一晩振とう培養した。この培養液3mlから、h7-3を含むプラスミドpUC(h7-3)を抽出した(図1)。抽出されたプラスミドを、エタノール沈殿し、70%エタノール洗浄後、滅菌蒸留水50μlに溶解した。pUC(h7-3)に挿入されたh7-3のヌクレオチド配列を調べた結果、クローニングされたh7-3は、当初設計されたヌクレオチド配列(配列表の配列番号52)のヌクレオチド番号154のものがcに置換されていたが、その箇所にコードされるアミノ酸Ser(配列表の配列番号53のアミノ酸番号48)のコドンには変化を与えなかったため、そのまま以下の実施例に使用した。置換後のh7-3のヌクレオチド配列、および該配列にコードされるアミノ酸配列を、配列表の配列番号14および15に示した。

【0149】2) ペプチド11の調製

上記1)で調製されたpUC(h7-3)を制限酵素BamHIとSalIで消化し、2%低融点アガロースゲルを用いた電気泳動で小断片(約310bp)を精製した。一方、これとは別にpUC(h7-3)を制限酵素BglIIとSalIで消化し、1.0%低融点アガロースゲル電気泳動で大断片(約3.0kbp)を精製し

た。次に、DNAライゲーションキットを用いてこれら断片を連結することにより、配列表の配列番号61に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列(配列表の配列番号60)を含むプラスミドpUC(h7-3)₂を得た(図1)。

【0150】実施例9の3)と同様にして、pUC(h7-3)₂で、コンピテント大腸菌YA21株を形質転換した(JM109株でも可能)。この形質転換株を、400mlの2×TY培地を入れた2リットル容三角フラスコに接種し、37℃で8時間、回転振とう培養した。得られた培養液(OD_{660nm}=2.5)の全量を120リットルの2×TY培地を入れた200リットル容培養槽に移し、さらに、37℃で17時間、溶存酸素濃度を5ppmに維持する様に、通気攪拌条件を変えて培養を継続した。

【0151】培養終了後、培養液(OD₆₀₀=8.6)を、15%(v/v)硫酸でpH3.0に調整し、30分攪拌後、20%(w/v)水酸化ナトリウムでpH7.0に戻した。膜ろ過(膜の孔径:0.2μm)により菌体濃縮液を得た後、遠心分離を行って沈殿を回収し湿菌体580gを得た。20mM TES緩衝液(20mM トリス-塩酸(pH7.6)、150mM 塩化ナトリウム、10mMEDTA)で5リットルの菌体懸濁液(SDS-PAGE解析による重合タンパク質の濃度が約20%)を調整し、このものを、セルホモジナイザー(APVゴーリン社製)を4回通過(50Mpa)させて菌体を破砕した後、0.4%トリトンX-100(終濃度)を含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.6)および50mM トリス-塩酸緩衝液で洗浄・遠心分離することにより、スラリー(SDS-PAGE解析による重合タンパク質の濃度が約33%)2.5リットルを得た。このスラリー全量に5リットルの10M尿素水溶液を添加した溶液に、25%(w/v)水酸化ナトリウム水溶液でpHを8.7に調整しながら、4.8mlの無水シトラコン酸を15分毎に8回添加した。このシトラコニル化終了液を37℃、pH7.6に調整後、7.5リットルの20mM 硝酸カルシウムおよび264mgのトリプシンを添加して、36℃で保温した。1時間後、150mlのTFAを添加して反応を停止した。この反応液を遠心分離して沈殿272gを得た。

【0152】この沈殿68gを100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)2リットルに懸濁し、8リットルの10M尿素溶液および0.5リットルのβ-メルカプトエタノールを加えてから、2リットルの陽イオン交換樹脂(SP-セファロースFF、ファルマシア社製)に吸着させた。樹脂を8M尿素/20mMリン酸ナトリウム(pH6.0)/10mM DTTで洗浄後、0.05M、0.1M、0.2M、0.3Mおよび2.0Mの塩化ナトリウムを含む溶出液(8M尿素、2

0mMリン酸ナトリウムおよび10mM DTT、pH 6)で順次溶出した。目的のペプチドは0.2M 塩化ナトリウム濃度の溶出画分に含まれていたため、この画分を純水で2倍に希釈した後、塩化ナトリウムを終濃度3Mとなるように加え、遠心分離を行って沈殿を回収した。沈殿に純水を加えて懸濁した後、遠心分離して上清を回収し、アセトニトリル、TFAをそれぞれ終濃度20%、0.1%になるように添加してから、下記の条件で逆相クロマトグラフィー精製を行なった：

カラム：ODSカラム (YMC-パックODS、 ϕ 10cm \times 50cm、YMC社製)

移動相：20-60% アセトニトリル/0.1% TFA、65分 (直線濃度勾配)

流速：260ml/分

検出波長：230nm

溶出時間44.3分付近のピークを分取し、得られた物質について、N末端から20残基までのアミノ酸配列分析を行った結果、配列表の配列番号13のアミノ酸番号1から20に示されるアミノ酸配列と一致した。以上のようにして、650mgのペプチド11を得た。

【0153】3) ペプチド12の調製

ペプチド12を調製するための直接発現用ベクターpU

PCR (1)

反応液組成：

鋳型DNA	pUC18	2ng
10pmol/ μ l	プライマー P1	2.5 μ l
10pmol/ μ l	プライマー P2	2.5 μ l
10倍濃度	Ex Taq PCR緩衝液	5 μ l
dNTP混合液		4 μ l
Ex Taq	ポリメラーゼ	0.5単位
滅菌蒸留水で全量を50 μ lとした。		

温度条件：94℃で1分間加熱した後、94℃で30秒、50℃で30秒、72℃で2.5分の温度サイクル

C18M5は、pUC18ベクターのヌクレオチド配列 (GenBank Accession No.L08752) のヌクレオチド番号177のgをcに置換して、制限酵素MunIの切断部位を有するpUC18Mベクターを作製し (図4)、さらに同ヌクレオチド番号169-170のgtをaaに置換することにより、lacプロモーターをlacUV5プロモーターに変えたものである。これらの変異の導入は、RT-PCR法 (Douglas, H. et al. BioTechniques, 8, 178 (1990)) を利用して行なった (図3)。

【0154】まずプライマーとして、以下に記載するオリゴヌクレオチド：

5'- tccgctcgt atgttgtgtg caattgtgag c -3' (P1、配列表の配列番号62)；

5'- agcataaagt gtaaagcctg gg -3' (P2、配列表の配列番号63)；

5'- attgttatcc gctcacaatt gcacacaaca ta -3' (P3、配列表の配列番号64)；および

5'- ttcacacagg aaacagctat gacc -3' (P4、配列表の配列番号65)

を合成した。

【0155】次に、以下の各条件でPCRを実施した：

を30回繰り返した後、72℃で7分間保温した。

【0156】

PCR (2)

反応液組成：

鋳型	pUC18	2ng
10pmol/ μ l	プライマー P3	2.5 μ l
10pmol/ μ l	プライマー P4	2.5 μ l
10倍濃度	Ex Taq PCR緩衝液	5 μ l
dNTP混合液		4 μ l
Ex Taq	ポリメラーゼ	0.5単位
滅菌蒸留水で全量を50 μ lとした。		

温度条件：上記PCR (1) に同じ。

【0157】PCR (1) および (2) の反応産物を、それぞれイソプロパノール沈殿し、滅菌蒸留水20 μ l

に溶解した。各産物を混合し、下記の条件でアニーリング操作を行った：

反応液組成

PCR (1) の反応産物	1 μ l
PCR (2) の反応産物	1 μ l
10倍濃度	アニーリング緩衝液
(0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0))、	

10mM EDTA、1M 塩化ナトリウム) 5 μ l

滅菌蒸留水で全量を50 μ lとした。

温度条件：94℃で3分間加熱し、50℃で2時間保温後、室温(25℃)に冷却した。

【0158】次いで、実施例9の1)記載の方法で、アニーリング後の反応液5 μ lを用いてコンピテント大腸菌JM109株を形質転換し、200 μ gのイソプロピルチオガラクトピラノシド(以下「IPTG」という)および800 μ gの5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド(以下「X-gal」という)を含むレーブロス寒天培地に塗り広げ、37℃で培養した。出現した青色のコロニーを単離し、50 μ g/mlのアmpiシリンを含むレーブロス培地で一晚培養して、培養液からプラスミドを抽出した。このプラスミドにMun I認識部位が存在するか否かは、プラスミドを制限酵素Mun Iで消化し、1%アガロースゲル電気泳動した結果、約2.8kbpの位置にバンドが1本現れたことで確認された。また、変異を導入した部位のヌクレオチド配列も確認された。さらに、該プラスミドを保持する形質転換体がIPTGおよびX-gal

反応液組成：

鋳型 pUC18M	10ng
10pmol/ μ l プライマー P21	2.5 μ l
10pmol/ μ l プライマー P22	2.5 μ l
10倍濃度 Ex Taq PCR緩衝液	5 μ l
dNTP混合液	4 μ l
Ex Taq ポリメラーゼ	1.25単位

滅菌蒸留水で全量を50 μ lとした。

温度条件：94℃で3分間加熱した後、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で3分の温度サイクルを3

を含むレーブロス寒天培地上で青色コロニーを形成することから、置換後のLacZ遺伝子が正常に機能していることが示された。

【0159】次に、pUC18Mベクターを鋳型として、lacプロモーターをlacUV5プロモーターに変える変異を導入するためのプライマーとして、以下に記載するオリゴヌクレオチド：

5'-tttatgcttc cggctcgtat aatgtgtgca at -3' (P21、配列表の配列番号66)；
5'-gtgtaaagcc tgggtgcct aa -3' (P22、配列表の配列番号67)；
5'-tccgctcaca attgcacaca ttatacgagc cg -3' (P23、配列表の配列番号68)；および
5'-taacaatttc acacaggaaa cag -3' (P24、配列表の配列番号69)

を合成し、下記の条件でPCRを実施した：PCR (3)

0回繰り返した後、72℃で10分間保温した。

【0160】

PCR (4)

反応液組成：

鋳型 pUC18M	10ng
10pmol/ μ l プライマー P23	2.5 μ l
10pmol/ μ l プライマー P24	2.5 μ l
10倍濃度 Ex Taq PCR緩衝液	5 μ l
dNTP混合液	4 μ l
Ex Taq ポリメラーゼ	1.25単位

滅菌蒸留水で全量を50 μ lとした。

温度条件：上記PCR (3)に同じ。

【0161】各PCR後の反応産物を、イソプロパノール沈殿して70%エタノールで洗浄後、それぞれ滅菌蒸留水20 μ lに溶解して、両者を下記の条件でアニーリングさせた：

反応液組成：

10倍濃度のアニーリング緩衝液	5 μ l
PCR (3)の反応産物	1 μ l
PCR (4)の反応産物	1 μ l

滅菌蒸留水で全量を50 μ lとした。

温度条件：94℃で3分間加熱し、50℃で2時間保温

後、室温(25℃)に冷却した。

【0162】次いで、実施例9の1)記載の方法で、アニーリング後の反応液5 μ lを用いてコンピテント大腸菌JM109株を形質転換し、200 μ gのIPTGおよび800 μ gのX-galを含むレーブロス寒天培地に塗り広げ、37℃で培養した。出現した青色のコロニーを単離し、50 μ g/mlのアmpiシリンを含むレーブロス培地で一晚培養してプラスミドを抽出した。目的の変異が導入されていることは、得られたプラスミドのヌクレオチド配列を解析することにより確認された。また、該プラスミドを保持する形質転換体がIPTGおよび

びX-galを含むL-プロス寒天培地上で青色コロニーを形成することから、変異導入により新たに作られたlacUV5プロモーターは、正常に機能していることが示された。以上の操作により、ペプチド12を調製するための直接発現用ベクターpUC18M5（配列表の配列番号70）を得た。

【0163】次いで、上記1）で得られたh7-3を、pUC18M5ベクターのlacUV5プロモーターの3'末端側の開始コドン（atg）の直後に連結するためのPCR用プライマーとして、以下に記載するオリゴヌクレオチド：

5'- ggtatcatcg cagcatacca gaa -3'（P101、配列表の配列番号71）；

5'- ttaacccatc agggtagaac cg -3'（P102、配列表の配列番号72）；

5'- gataacaatt tcacacagga aacagctatg ggtatcatcg cagcatacca gaa -3'（P103、配列表の配列番号73）；

5'- agaggatccc cgggtaccga gctcgaattc ttaacccatc agggtagaac cg -3'（P104、配列表の配列番号74）；

5'- gaattcgagc tcggtagccg gg -3'（P105、配列表の配列番号75）；

5'- catagctgtt tcctgtgtga aa -3'（P106、配列表の配列番号76）；

5'- agagtcgacc tgcaggcatg ca -3'（P107、配列表の配列番号77）；および

5'- cgctcacaat tgcacacatt at -3'（P108、配列表の配列番号78）

を合成し、下記の条件でPCRを実施した：

PCR（5）

反応液組成：

鋳型DNA	pUC（h7-3）	200 ng
10 pmol/μl	プライマー P101	2.5 μl
10 pmol/μl	プライマー P102	2.5 μl
10倍濃度	Ex Taq PCR緩衝液	5 μl
	dNTP混合液	4 μl
Ex Taq	ポリメラーゼ	1.25単位

滅菌蒸留水で全量を50 μlとした。

温度条件：94℃で3分間加熱した後、94℃で30 0回繰り返した後、72℃で10分間保温した。
秒、55℃で30秒、72℃で3分の温度サイクルを3 【0164】

PCR（6）

反応液組成：

鋳型DNA	pUC（h7-3）	200 ng
10 pmol/μl	プライマー P103	2.5 μl
10 pmol/μl	プライマー P104	2.5 μl
10倍濃度	Ex Taq PCR緩衝液	5 μl
	dNTP混合液	4 μl
Ex Taq	ポリメラーゼ	1.25単位

滅菌蒸留水で全量を50 μlとした。

温度条件：上記PCR（5）に同じ。

【0165】

PCR（7）

反応液組成：

鋳型DNA溶液	pUC18M5	10 ng
10 pmol/μl	プライマー P105	2.5 μl
10 pmol/μl	プライマー P106	2.5 μl
10倍濃度	Ex Taq PCR緩衝液	5 μl
	dNTP混合液	4 μl
Ex Taq	ポリメラーゼ	1.25単位

滅菌蒸留水で全量を50 μlとした。

温度条件：上記PCR（5）に同じ。

【0166】

PCR（8）

反応液組成：

鋳型DNA溶液	pUC18M5	10 ng
10 pmol/μl	プライマー P107	2.5 μl

10 pmol/ μ l プライマー P108 2.5 μ l
 10倍濃度 Ex Taq PCR緩衝液 5 μ l
 dNTP混合液 4 μ l
 Ex Taq ポリメラーゼ 1.25単位
 滅菌蒸留水で全量を50 μ lとした。

温度条件：上記PCR(5)に同じ。

【0167】各PCR後の反応液についてイソプロパノール沈殿して、70%エタノール洗浄後、それぞれ20 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。その各5 μ lをとって2%低融点アガロースゲル電気泳動を行った。増幅されたDNA断片に相当するバンド部分のゲルを切り出し、3倍容のTE緩衝液を加えて、65℃で5分間保温してゲ

反応液組成：

PCR(5)～(8)の各反応産物溶液 各1 μ l
 10倍濃度 アニール緩衝液 10 μ l
 滅菌蒸留水で全量を100 μ lとした。

温度条件：94℃で3分間加熱して、50℃で2時間保温後、室温(25℃)に冷却した。

【0168】次いで、実施例9の1)記載の方法で、アニール後の反応液10 μ lを用いてコンピテント大腸菌JM109株を形質転換し、200 μ gのIPTGおよび800 μ gのX-galを含むレーブロス寒天培地に塗り広げ、37℃で培養した。出現した白色のコロニーを単離し、50 μ g/mlのアmpiシリンを含むレーブロス培地で一晚培養してプラスミドを抽出した。目的のプラスミドが得られたか否かは挿入断片のヌクレオチド配列を調べることにより確認された。以上のようにして、プラスミドpUCM5-h73を得た。

【0169】次に、このpUCM5-h73を制限酵素MunIおよびSalIで消化し、低融点アガロースゲル電気泳動を行って、ゲルよりその小断片(約360bp)を抽出した。一方、これとは別にpUCM5-h73を制限酵素EcoRIおよびSalIで消化し、低融点アガロースゲル電気泳動を行って、ゲルよりその大断片(約2.9kbp)を抽出した。これら二つの断片をDNAライゲーションキットを用いて連結することにより、プラスミドpUCM5-2h73を得た(図6)。

【0170】同様に、このpUCM5-2h73のMunI-SalI消化小断片(約700bp)およびEcoRI-SalI消化大断片(約3.3kbp)を連結することにより、プラスミドpUCM5-4h73を得て、さらにpUCM5-2h73のMunI-SalI消化小断片(約690bp)と、pUCM5-4h73のEcoRI-SalI消化大断片(約3.9kbp)を連結することにより、プラスミドpUCM5-6h73を得た(図6)。このpUCM5-6h73(配列表の配列番号79)は、多コピーの[リボゾーム結合領域+h7-3]という単位がpUC18M5由来のlacUV5プロモーターの3'末端側の開始コドン直後にいずれも直接連結されている。これらのプラスミドを大腸

菌を溶解させた。このものを等容のフェノール溶液で2回、フェノール・クロロホルム溶液で1回、クロロホルム溶液で1回抽出した後、エタノール沈殿を行い、沈殿を70%エタノールで洗浄後、それぞれ滅菌蒸留水10 μ lに溶解した。さらに、これらを混合し、下記の条件でアニールを行った：

菌に導入することにより、ペプチド12を直接、効率的に生産させることができる。

【0171】実施例9の3)と同様にして、5ngのpUCM5-6h73で、コンピテント大腸菌YA21株を形質転換した(JM109株でも可能)。この形質転換株を、100 μ g/mlのアmpiシリンを含む2×TY培地100mlに植菌し、37℃で14時間振とう培養を行った。培養終了後の培養液45mlをとり、6000×g、4℃、20分間の遠心分離を行なって沈殿した菌体を回収し、4.5mlのTES緩衝液に懸濁後、超音波ホモジナイザーで菌体を破碎した。このものを13000×g、4℃で20分間遠心分離して沈殿を回収し、さらにTES緩衝液での洗浄を3回繰り返した後、4.5mlの0.75% N-ラウリルサルコシン溶液で4回、さらに蒸留水で2回洗浄した(遠心分離条件：25000×g、4℃、20分間)。得られた沈殿を4.5mlの6M グアニジン溶液に懸濁し、37℃で振とうしながら可溶化した。1時間後、25000×g、4℃で20分間遠心分離して上清を回収し、ペプチド12の粗精製液とした。

【0172】上記の粗精製液1mlについて、下記の条件でゲルろ過クロマトグラフィー精製を行なった：

カラム：TSK-ゲルG-3000SW_{XL}(ϕ 7.8×300mm、東ソー(株)社製) 溶媒：0.1% TFAを含む30% アセトニトリル

流速：0.5ml/分

検出波長：280nm

保持時間20.2分付近のピークを回収し、さらに下記の条件で逆相HPLC精製を行なった：

カラム：ODSカラム(TSK-ゲルODS-120T)

移動相：36-43%アセトニトリル/0.1% TFA、35分(直線濃度勾配)

流速：2ml/分

検出波長：220 nm

保持時間13.4分付近のピークを分取し、N末端10残基までのアミノ酸配列解析を行った結果、配列表の配列番号15のアミノ酸番号1～10に示されるアミノ酸配列と一致した。また、ESI法にて分子量を測定した結果、ペプチド12の計算上の分子量とこのピークに主に含まれる物質の分子量とが一致した。以上のようにして、培養液100 mlあたり約6 mgのペプチド12を得ることができた。

【0173】〔参考例〕実施例9～11で作製されたpUC(h6-1)、pUC(h7-1)またはpUC(h7-3)を、制限酵素BamHIおよびSalIで消化し、それらの小断片(それぞれ約270 bp、約300 bpまたは約310 bp)をアガロースゲル電気泳動で精製した。一方クローニングベクターpBR322を制限酵素BamHIおよびSalIで消化し、その大断片(約4.1 kbp)をアガロースゲル電気泳動で精製した。これらのDNA断片を連結して得たプラスミドpBR(h6-1)、pBR(h7-1)またはpBR(h7-3)をコンピテント大腸菌JM109株に導入して得られた形質転換大腸菌E. coli pBR(h6-1) SANK 70199、E. coli pBR(h7-1) SANK 70299およびE. coli pBR(h7-3) SANK 70399は、平成10年(1998)年2月9日付で工業技術院生命工業技術研究所に寄託され、それぞれ受託番号FERM BP-6642、FERM BP-6643およびFERM BP-6644が付された。

【0174】〔実施例12〕スギ花粉抗原T細胞エпитープ活性

スギ花粉症患者由来のT細胞を用い、本発明のペプチド1乃至12のスギ花粉抗原T細胞エピトープ活性を以下に記載する方法により確認した。スギ花粉症症状を示す患者から50 mlの末梢血を採取した。末梢血をハンス平衡塩溶液(Hanks' Balanced Salt Solution、HBSS)で希釈した後、フィコール・バック比重遠心法により末梢血単核球(Peripheral Blood Mononuclear Cells、以下「PBMC」という)を分画し、培地(5%のヒトAB型血清を含むRPMI 1640)に懸濁した。

【0175】96穴の平底プレートに1ウェルあたり 4×10^5 個の細胞を分注した。同時に各ウェルに最終濃度が $1 \mu\text{g/ml}$ となるようにペプチド1、2、3、7または8を、あるいは最終濃度が 100 nM となるようにペプチド4、5、6、11または12を、あるいは最終濃度が 50 nM となるようにペプチド9または10を添加した。陰性対照として、何もペプチドを加えない群を用意した。細胞を $200 \mu\text{l}$ の培地中で 37°C 、5%炭酸ガス下で72時間培養した。その後、 $0.5 \mu\text{Ci}$ のトリチウム化チミジンを加え、さらに16時間培養した。セルハーベスターを用いて各ウェルの細胞をガラス

繊維フィルター上に集め、それぞれ液体シンチレーションカウンターで細胞に取りこまれたトリチウム化チミジン量を測定した。取り込みチミジン量を陰性対照群の取り込み量で除した数値をT細胞刺激指数とし、このT細胞刺激指数が2を越える値に達した群をT細胞エピトープ活性「陽性」とした。この結果を表1に示す。

【0176】

【表1】

ペプチド	T細胞エピトープ活性
ペプチド1	陽性
ペプチド2	陽性
ペプチド3	陽性
ペプチド4	陽性
ペプチド5	陽性
ペプチド6	陽性
ペプチド7	陽性
ペプチド8	陽性
ペプチド9	陽性
ペプチド10	陽性
ペプチド11	陽性
ペプチド12	陽性

【0177】実施例1乃至11で調製されたペプチドはいずれもT細胞エピトープ活性「陽性」を示した。

〔実施例13〕連結による相乗効果

T細胞エピトープペプチドを連結したことにより、連結ペプチドのT細胞エピトープ活性が相乗的な活性亢進を示すことを、以下の方法により示した。

【0178】まず、対照として使用する、連結されていない単独のT細胞エピトープからなる下記のペプチド：

Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp

(ペプチド13、T細胞エピトープ「A」に相当、配列表の配列番号16)；

Gln-Phe-Ala-Lys-Leu-Thr-Gly-Phe-Thr-Leu-Met-Gly

(ペプチド14、T細胞エピトープ「B」に相当、配列表の配列番号17)；

Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Thr

(ペプチド15、T細胞エピトープ「C」に相当、配列表の配列番号18)；

Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Asn

(ペプチド16、T細胞エピトープ「D」に相当、配列表の配列番号19)；

Ser-Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly-Pro (ペプチド17、T細胞エピトープ「E」に相当、配列表の配列番号20)；

Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly (ペプチド18、T細胞エピトープ「E'」に相当、配列表の配列番号21)；

Tyr-Gly-Leu-Val-His-Val-Ala-Asn-Asn-Asn-Tyr-Asp-Pro (ペプチド19、T細胞エピトープ「F」に相当、配列表の配列番号22)；および

Ser-Gly-Lys-Tyr-Glu-Gly-Gly-Asn-Ile-Tyr-Thr-Lys-Lys-Glu-Ala-Phe-Asn-Val-Glu (ペプチド20、T細胞エピトープ「G」に相当、配列表の配列番号23)

を、実施例7記載と同様の方法で合成した。

【0179】一方、スギ花粉症症状を示す患者から50 mlの末梢血を採取し、HBSSで希釈した後、フィコール・バック比重遠心法によりPBMCを分画し、培地（5%のヒトAB型血清を含むRPMI 1640）に懸濁した。96穴の平底プレートに1ウェルあたり4×10⁵個の細胞を分注し、同時に各ウェルにペプチド1、2、3、4、5、6、11、または12を最終濃度が10 pM乃至100 nMとなるように添加した。ペプチド9およびペプチド10については、各ウェルにペプチド9または10を最終濃度が5 pM乃至50 nMとなるように添加した。またペプチド混合培養群として、以下の4群を設けた。すなわち、1ウェルあたりペプチド13、15、16、17、19および20の各々が最終濃度10 pM乃至100 nMとなるように添加した群、1ウェルあたりペプチド13、15、16、18、19および20の各々が最終濃度10 pM乃至100 nMとなるように添加した群、1ウェルあたりペプチド13、14、15、16、17、19および20の各々が最終濃度10 pM乃至100 nMとなるように添加した群、さらに、1ウェルあたりペプチド7、8、14、16、17、19および20の各々が最終濃度10 pMから100 nMとなるように添加した群を設けた。このように条件設定した細胞を200 μlの培地中で37℃、5%炭酸ガス下で72時間培養した。その後、0.5 μCiのトリチウム化チミジンを加え、さらに16時間培養した。セルハーベスターを用いて各ウェルの細胞をガラス繊維フィルター上に集め、それぞれ液体シンチレーションカウンターで細胞に取りこまれたトリチウム化チミジン量を測定した。そして、ペプチド1またはペプチド9添加群については、これらとT細胞エпитープの構成が共通となるペプチド13、15、16、17、19および20の混合培養群とT細胞エпитープ活性を比較した（図7）。ペプチド2またはペプチド3添加群について

は、同様にペプチド13、15、16、18、19および20の混合培養群とT細胞エпитープ活性を比較した（図8）。ペプチド4またはペプチド10添加群については、同様にペプチド13、14、15、16、17、19および20の混合培養群とT細胞エпитープ活性を比較した（図9）。またペプチド5、ペプチド6、ペプチド11、またはペプチド12添加群については、同様にペプチド7、8、14、16、17、19および20の混合培養群とT細胞エпитープ活性を比較した（図10、図11）。ただしペプチド9およびペプチド10添加群の結果については、該ペプチドに各T細胞エпитープが2つずつ含まれていることを補正するため、実際のモル濃度の2倍の濃度の位置にプロットした。

【0180】その結果、添加した各T細胞エпитープとしての総量が同じでも、それらを連結した場合の方が、単に混合して添加した場合よりもT細胞エпитープとしての活性が少なくとも10倍は高くなることが示された。

【0181】〔実施例14〕 T細胞エпитープペプチドの重要度

スギ花粉アレルゲンCry j 1またはCry j 2の何れかに対するT細胞の反応性がT細胞刺激指数2を越える値に達したスギ花粉症患者114名を対象とし、ペプチド7およびペプチド8のT細胞エпитープ活性を実施例12に記載の方法に従って評価し、重要度指数を求めた。重要度指数（Positivity Index）とは、平均T細胞刺激指数に陽性頻度を乗じた数値で、WO94/01560号公報に記載されている。平均T細胞刺激指数は該ペプチドに陽性反応を示した被験者についてのT細胞刺激指数の幾何平均値、陽性頻度は該ペプチドに陽性反応を示した被験者の割合（百分率）をそれぞれ表す。結果を表2に示す。

【0182】

【表2】

ペプチド	平均T細胞刺激指数	陽性頻度	重要度指数
ペプチド7	5.52	57%	315
ペプチド8	4.62	54%	247

【0183】このように、ペプチド7およびペプチド8はいずれもスギ花粉症患者の間で高い重要度指数を示し、スギ花粉症に対する減感作療法用のペプチドとして有用であることが示された。

【0184】〔製剤例1〕 注射剤

安定剤として1%（w/v）ヒト血清アルブミンを含む生理食塩水に実施例1乃至11記載の方法により得たペプチドを最終濃度0.01、0.1または1 mg/mlとなるように溶解し、ろ過滅菌した後、滅菌バイアル瓶に2 mlずつ分注し、凍結乾燥し、密栓する。本品は投与に先立ち、まずバイアル瓶内に注射用蒸留水等を1 ml加え、次いで内容物を均一に溶解して使用する。安定

性に優れ、有効成分として本発明によるペプチドを含んでなる本品は、スギ花粉症を治療・予防するための乾燥製剤として有用である。

【0185】〔製剤例2〕 シロップ剤

実施例1乃至11記載の方法により得たペプチドのいずれかを0.1 mg/mlに、トレハロース粉末（トレハオース、（株）林原生物化学研究所製）を50%（w/v）になるように、それぞれ蒸留水に溶解し、溶液を常法により滅菌ろ過して12種類のシロップ状物を得る。これらのシロップ状物を2 mlずつ滅菌バイアル瓶にそれぞれ別々に分注し、密栓する。安定性に優れ、摂取し易い本品は、スギ花粉症を治療・予防するためのシロッ

剤として有用である。

【0186】〔急性毒性試験〕生後20日目のマウスに、製剤例1または2記載の方法により得た製剤を常法により経口または腹腔投与する。被検試料は、いずれの投与経路によっても、LD50が（ペプチドとして）200mg/kgマウス体重以上であり、このことは、本発明のペプチドが、ヒトを含む哺乳類に投与する抗スギ花粉症剤に安全に配合使用し得ることを示す。

【0187】

【発明の効果】本発明により、スギ花粉アレルゲンのT細胞エピトープからなるペプチドおよびそれらを有効成分として含んでなる抗スギ花粉症剤を提供することができた。そして、本発明のペプチドは、スギ花粉アレルゲ

ンに特異的なイムノグロブリンE抗体に実質的に反応しないので、ヒトを含む哺乳類一般に投与すると、実質的にアナフィラキシーを引き起こすことなく、スギ花粉アレルゲンに特異的なT細胞を不活性化することができる。しかも、その分子内に異なる6または7個のT細胞エピトープを含む本発明のペプチドは、それぞれのエピトープを混合して投与するよりも低用量で活性があり、患者への投与量を少なくすることができる。また、本発明のペプチドを有効成分として含んでなる抗スギ花粉症剤は、低用量にしてより広範なスギ花粉症患者に対して有効である。

【0188】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>; Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo
Sankyo Company, Limited

<120>; Peptides and The Uses Thereof

<130>; P00-0129

<150>; JP99/68316

<151>; 1999-3-15

<160>; 80

<170>; PatentIn Ver. 2.0

<210>; 1

<211>; 81

<212>; PRT

<213>; Artificial Sequence

<220>;

<223>; Description of Artificial Sequence: Designed
peptide which consists of T cell epitopes derived
from cedar pollen allergens

<400>; 1

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser Met Lys Val
1 5 10 15

Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys Asn Phe His
20 25 30

Leu Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu
35 40 45

Asn Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala

50 55 60
Phe Asn Val Glu Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp
65 70 75 80

Pro

<;210>; 2
<;211>; 79
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
peptide which consists of T cell epitopes derived
from cedar pollen allergens

<;400>; 2
Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Met Lys Val Thr
1 5 10 15

Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln
20 25 30

Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Tyr
35 40 45

Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Lys Tyr
50 55 60

Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu
65 70 75

<;210>; 3
<;211>; 79
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
peptide which consists of T cell epitopes derived
from cedar pollen allergens

<;400>; 3
Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Met Lys Val Thr
1 5 10 15

Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln
20 25 30

Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Ser
 35 40 45

Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn
 50 55 60

Val Glu Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro
 65 70 75

<;210>; 4

<;211>; 93

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide which consists of T cell epitopes derived
 from cedar pollen allergens

<;400>; 4

Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Gly Ile Ile Ala
 1 5 10 15

Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe
 20 25 30

Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn
 35 40 45

Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu
 50 55 60

Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly
 65 70 75 80

Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu
 85 90

<;210>; 5

<;211>; 95

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide which consists of T cell epitopes derived
 from cedar pollen allergens

<;400>; 5

Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Gly Ile Ile Ala

1	5	10	15
Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala			
20	25	30	
Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu			
35	40	45	
Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Tyr			
50	55	60	
Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Lys Tyr			
65	70	75	80
Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu			
85	90	95	

<;210>; 6

<;211>; 99

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide which comprises T cell epitopes derived
 from cedar pollen allergens

<;400>; 6

Gly Asp Pro Arg Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly			
1	5	10	15
Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys			
20	25	30	
Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys			
35	40	45	
Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser			
50	55	60	
Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro			
65	70	75	80
Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe			
85	90	95	
Asn Val Glu			

<;210>; 7

<;211>; 13

<;212>; PRT

<;213>; *Cryptomeria japonica*

<;400>; 7

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys

1 5 10

<;210>; 8

<;211>; 13

<;212>; PRT

<;213>; *Cryptomeria japonica*

<;400>; 8

Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn

1 5 10

<;210>; 9

<;211>; 558

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (1)..(558)

<;220>;

<;221>; mat#peptide

<;222>; (4)..(558)

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed

sequence encoding a polypeptide which comprises

T cell epitopes derived from cedar pollen allergens

<;400>; 9

atg acc atg att acg aat tcg agc tcg gta ccc ggg gat ccg cgt ggt 48

Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Ser Ser Val Pro Gly Asp Pro Arg Gly

-1 1 5 10 15

atc atc gca gca tac cag aac ccg gca tct tgg tct atg aaa gtt acc 96

Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser Met Lys Val Thr

20 25 30

gtt gct ttc aac cag ttc ggt ccg ttc gca tct aaa aac ttc cat ctg 144

Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu

35 40 45

cag aaa aac acc aaa ctg acc tct ggt aaa atc gca tct tgc ctg aac 192

Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn

50 55 60

tac ggt ctg gtt cat gtt gca aac aac aac tac gac ccg tct ggt aaa 240
 Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Lys
 65 70 75

tac gaa ggt ggt aac atc tac acc aaa aaa gaa gca ttc aat gtt gaa 288
 Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu
 80 85 90 95

cgt gca gat ccg cgt ggt atc atc gca gca tac cag aac ccg gca tct 336
 Arg Ala Asp Pro Arg Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser
 100 105 110

tgg tct atg aaa gtt acc gtt gct ttc aac cag ttc ggt ccg ttc gca 384
 Trp Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala
 115 120 125

tct aaa aac ttc cat ctg cag aaa aac acc aaa ctg acc tct ggt aaa 432
 Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys
 130 135 140

atc gca tct tgc ctg aac tac ggt ctg gtt cat gtt gca aac aac aac 480
 Ile Ala Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn
 145 150 155

tac gac ccg tct ggt aaa tac gaa ggt ggt aac atc tac acc aaa aaa 528
 Tyr Asp Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys
 160 165 170 175

gaa gca ttc aat gtt gaa cgt gca gat ctg 558
 Glu Ala Phe Asn Val Glu Arg Ala Asp Leu
 180 185

<;210>; 10

<;211>; 186

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide which comprises T cell epitopes derived
 from cedar pollen allergens

<;400>; 10

Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Ser Ser Val Pro Gly Asp Pro Arg Gly
 -1 1 5 10 15

Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser Met Lys Val Thr
 20 25 30

Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu

	35		40		45										
Gln	Lys	Asn	Thr	Lys	Leu	Thr	Ser	Gly	Lys	Ile	Ala	Ser	Cys	Leu	Asn
	50						55					60			
Tyr	Gly	Leu	Val	His	Val	Ala	Asn	Asn	Asn	Tyr	Asp	Pro	Ser	Gly	Lys
	65					70					75				
Tyr	Glu	Gly	Gly	Asn	Ile	Tyr	Thr	Lys	Lys	Glu	Ala	Phe	Asn	Val	Glu
	80				85					90					95
Arg	Ala	Asp	Pro	Arg	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Tyr	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser
				100				105						110	
Trp	Ser	Met	Lys	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Asn	Gln	Phe	Gly	Pro	Phe	Ala
			115					120					125		
Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Asn	Thr	Lys	Leu	Thr	Ser	Gly	Lys
	130					135						140			
Ile	Ala	Ser	Cys	Leu	Asn	Tyr	Gly	Leu	Val	His	Val	Ala	Asn	Asn	Asn
	145					150					155				
Tyr	Asp	Pro	Ser	Gly	Lys	Tyr	Glu	Gly	Gly	Asn	Ile	Tyr	Thr	Lys	Lys
160					165					170					175
Glu	Ala	Phe	Asn	Val	Glu	Arg	Ala	Asp	Leu						
				180					185						

<;210>; 11

<;211>; 630

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (1)..(630)

<;220>;

<;221>; mat#peptide

<;222>; (4)..(630)

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
sequence encoding a polypeptide which comprises
T cell epitopes derived from cedar pollen allergens

<;400>; 11

atg acc atg att acg aat tcg agc tcg gta ccc ggg gat ccg cgt ggt 48
Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Ser Ser Val Pro Gly Asp Pro Arg Gly

-1	1	5	10	15	
atc	atc	gca	gca	tac	cag aac ccg gca tct tgg tct atg aaa gtt acc 96
Ile	Ile	Ala	Ala	Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser Met Lys Val Thr	
		20		25	30
gtt	gct	ttc	aac	cag ttc ggt ccg ttc gca tct aaa aac ttc cat ctg 144	
Val	Ala	Phe	Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu		
		35		40	45
cag	aaa	aac	acc	aaa ctg acc tct ggt aaa atc gca tct tgc ctg aac 192	
Gln	Lys	Asn	Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn		
		50		55	60
tac	ggt	ctg	gtt	cat gtt gca aac aac aac tac gac ccg tct ggt aaa 240	
Tyr	Gly	Leu	Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Lys		
		65		70	75
tac	gaa	ggt	ggt	aac atc tac acc aaa aaa gaa gca ttc aac gtt gaa 288	
Tyr	Glu	Gly	Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu		
	80		85		90 95
cag	ttc	gct	aaa	ctg acc ggt ttc acc ctg atg ggt cgt gca gat ccg 336	
Gln	Phe	Ala	Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg Ala Asp Pro		
		100		105	110
cgt	ggt	atc	atc	gca gca tac cag aac ccg gca tct tgg tct atg aaa 384	
Arg	Gly	Ile	Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser Met Lys		
		115		120	125
gtt	acc	gtt	gct	ttc aac cag ttc ggt ccg ttc gca tct aaa aac ttc 432	
Val	Thr	Val	Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys Asn Phe		
		130		135	140
cat	ctg	cag	aaa	aac acc aaa ctg acc tct ggt aaa atc gca tct tgc 480	
His	Leu	Gln	Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys		
		145		150	155
ctg	aac	tac	ggt	ctg gtt cat gtt gca aac aac aac tac gac ccg tct 528	
Leu	Asn	Tyr	Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser		
	160		165		170 175
ggt	aaa	tac	gaa	ggt	ggt aac atc tac acc aaa aaa gaa gca ttc aac 576
Gly	Lys	Tyr	Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn		
		180		185	190
gtt	gaa	cag	ttc	gct	aaa ctg acc ggt ttc acc ctg atg ggt cgt gca 624
Val	Glu	Gln	Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg Ala		
		195		200	205

gat ctg
Asp Leu

630

<;210>; 12
<;211>; 210
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
peptide which comprises T cell epitopes derived
from cedar pollen allergens

<;400>; 12
Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Ser Ser Val Pro Gly Asp Pro Arg Gly
-1 1 5 10 15

Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser Met Lys Val Thr
20 25 30

Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu
35 40 45

Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn
50 55 60

Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Lys
65 70 75

Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu
80 85 90 95

Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg Ala Asp Pro
100 105 110

Arg Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser Met Lys
115 120 125

Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys Asn Phe
130 135 140

His Leu Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys
145 150 155

Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser
160 165 170 175

Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn
180 185 190

Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg Ala
195 200 205

Asp Leu

<;210>; 13

<;211>; 96

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
sequence of a polypeptide which comprises T cell
epitopes derived from cedar pollen allergens

<;400>; 13

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys
1 5 10 15

Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys
20 25 30

Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser
35 40 45

Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro
50 55 60

Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe
65 70 75 80

Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg
85 90 95

<;210>; 14

<;211>; 291

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
sequence encoding a polypeptide which consists of
T cell epitopes derived from cedar pollen allergens

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (1)..(291)

<;220>;

<;221>; mat#peptide

<;222>; (4)..(291)

<;400>; 14

atg ggt atc atc gca gca tac cag aac ccg gca tct tgg aaa tct atg	48
Met Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met	
-1 1 5 10 15	

aaa gtt acc gtt gct ttc aac cag ttc ggt ccg gac atc ttc gca tct	96
Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser	
20 25 30	

aaa aac ttc cat ctg cag aaa aac aaa ctg acc tct ggt aaa atc gca	144
Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala	
35 40 45	

tcc tgc ctg aac tac ggt ctg gtt cat gtt gca aac aac aac tac gac	192
Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp	
50 55 60	

ccg tct ggt aaa tac gaa ggt ggt aac atc tac acc aaa aaa gaa gca	240
Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala	
65 70 75	

ttc aac gtt gaa cag ttc gct aaa ctg acc ggt ttc acc ctg atg ggt	288
Phe Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly	
80 85 90 95	

cgt	291
Arg	

<;210>; 15

<;211>; 97

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
peptide which consists of T cell epitopes derived
from cedar pollen allergens

<;400>; 15

Met Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met
-1 1 5 10 15

Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser
20 25 30

Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala
35 40 45

Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp
50 55 60

Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala
65 70 75

Phe Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly
80 85 90 95

Arg

<;210>; 16

<;211>; 12

<;212>; PRT

<;213>; *Cryptomeria japonica*

<;400>; 16

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp
1 5 10

<;210>; 17

<;211>; 12

<;212>; PRT

<;213>; *Cryptomeria japonica*

<;400>; 17

Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly
1 5 10

<;210>; 18

<;211>; 12

<;212>; PRT

<;213>; *Cryptomeria japonica*

<;400>; 18

Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr
1 5 10

<;210>; 19

<;211>; 12

<;212>; PRT

<;213>; *Cryptomeria japonica*

<;400>; 19

Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn
1 5 10

<;210>; 20

<;211>; 13

<;212>; PRT

<;213>; *Cryptomeria japonica*

<;400>; 20

Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro

1 5 10

<;210>; 21

<;211>; 11

<;212>; PRT

<;213>; *Cryptomeria japonica*

<;400>; 21

Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly

1 5 10

<;210>; 22

<;211>; 13

<;212>; PRT

<;213>; *Cryptomeria japonica*

<;400>; 22

Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro

1 5 10

<;210>; 23

<;211>; 19

<;212>; PRT

<;213>; *Cryptomeria japonica*

<;400>; 23

Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe

1 5 10 15

Asn Val Glu

<;210>; 24

<;211>; 274

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed DNA
encoding a polypeptide which consists of T cell
epitopes derived from cedar pollen allergens

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (2)..(265)

<;400>; 24

g gat ccg cgt ggt atc atc gca gca tac cag aac ccg gca tct tgg tct 49
 Asp Pro Arg Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser
 1 5 10 15

atg aaa gtt acc gtt gct ttc aac cag ttc ggt ccg ttc gca tct aaa 97
 Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys
 20 25 30

aac ttc cat ctg cag aaa aac acc aaa ctg acc tct ggt aaa atc gca 145
 Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala
 35 40 45

tct tgc ctg aac tac ggt ctg gtt cat gtt gca aac aac aac tac gac 193
 Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp
 50 55 60

ccg tct ggt aaa tac gaa ggt ggt aac atc tac acc aaa aaa gaa gca 241
 Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala
 65 70 75 80

ttc aat gtt gaa cgt gca gat ctg taagtcgac 274
 Phe Asn Val Glu Arg Ala Asp Leu
 85

<;210>; 25

<;211>; 88

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide which consists of T cell epitopes derived
 from cedar pollen allergens

<;400>; 25

Asp Pro Arg Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser
 1 5 10 15

Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys
 20 25 30

Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala
 35 40 45

Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp
 50 55 60

Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala
 65 70 75 80

Phe Asn Val Glu Arg Ala Asp Leu

85

<;210>; 26
 <;211>; 14
 <;212>; PRT
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Linker peptide

<;400>; 26
 Thr Met Ile Thr Asn Ser Ser Ser Val Pro Gly Asp Pro Arg
 1 5 10

<;210>; 27
 <;211>; 5
 <;212>; PRT
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Linker peptide

<;400>; 27
 Arg Ala Asp Pro Arg
 1 5

<;210>; 28
 <;211>; 310
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Designed DNA
 encoding a polypeptide which consists of T cell
 epitopes derived from cedar pollen allergens

<;220>;
 <;221>; CDS
 <;222>; (11)..(289)

<;400>; 28
 ggatccgcgt ggt atc atc gca gca tac cag aac ccg gca tct tgg tct 49
 Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser
 1 5 10

atg aaa gtt acc gtt gct ttc aac cag ttc ggt ccg ttc gca tct aaa 97
 Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys
 15 20 25

aac ttc cat ctg cag aaa aac acc aaa ctg acc tct ggt aaa atc gca 145

Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala
 30 35 40 45

tct tgc ctg aac tac ggt ctg gtt cat gtt gca aac aac aac tac gac 193
 Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp
 50 55 60

ccg tct ggt aaa tac gaa ggt ggt aac atc tac acc aaa aaa gaa gca 241
 Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala
 65 70 75

ttc aac gtt gaa cag ttc gct aaa ctg acc ggt ttc acc ctg atg ggt 289
 Phe Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly
 80 85 90

cgtgcagatc tgtaagtcga c 310

<;210>; 29
 <;211>; 93
 <;212>; PRT
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide which consists of T cell epitopes derived
 from cedar pollen allergens

<;400>; 29
 Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser Met Lys Val
 1 5 10 15

Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys Asn Phe His
 20 25 30

Leu Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu
 35 40 45

Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly
 50 55 60

Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val
 65 70 75 80

Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly
 85 90

<;210>; 30
 <;211>; 274
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed DNA
encoding a polypeptide which consists of T cell
epitopes derived from cedar pollen allergens

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (11)..(253)

<;400>; 30

ggatccgct ggt atc atc gca gca tac cag aac ccg gca tct tgg tct 49
Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser
1 5 10

atg aaa gtt acc gtt gct ttc aac cag ttc ggt ccg ttc gca tct aaa 97
Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys
15 20 25

aac ttc cat ctg cag aaa aac acc aaa ctg acc tct ggt aaa atc gca 145
Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala
30 35 40 45

tct tgc ctg aac tac ggt ctg gtt cat gtt gca aac aac aac tac gac 193
Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp
50 55 60

ccg tct ggt aaa tac gaa ggt ggt aac atc tac acc aaa aaa gaa gca 241
Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala
65 70 75

ttc aac gtt gaa cgtgcagatc tgtaagtcga c 274
Phe Asn Val Glu
80

<;210>; 31

<;211>; 81

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
peptide which consists of T cell epitopes derived
from cedar pollen allergens

<;400>; 31

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Ser Met Lys Val
1 5 10 15

Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Phe Ala Ser Lys Asn Phe His

20 25 30
 Leu Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu
 35 40 45
 Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly
 50 55 60
 Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val
 65 70 75 80

Glu

<;210>; 32
 <;211>; 45
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
 polypeptide which consists of T cell epitopes
 derived from cedar pollen allergens

<;400>; 32
 gatccgcgtg gatatcatgc agcataccag aacccggcat cttgg 45

<;210>; 33
 <;211>; 47
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
 polypeptide which consists of T cell epitopes
 derived from cedar pollen allergens

<;400>; 33
 catagaccaa gatgccgggt tctggtatgc tgcgatgata ccacgcg 47

<;210>; 34
 <;211>; 39
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
 polypeptide which consists of T cell epitopes

derived from cedar pollen allergens

<;400>; 34

tctatgaaag ttaccgttgc ttcaaccag ttcggtccg

39

<;210>; 35

<;211>; 39

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 35

tgcaacgga ccgaactggt tgaaagcaac ggtaacttt

39

<;210>; 36

<;211>; 30

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 36

ttcgcatcta aaaacttcca tctgcagaaa

30

<;210>; 37

<;211>; 30

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 37

ggtgtttttc tgcagatgga agtttttaga

30

<;210>; 38

<;211>; 36

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 38

aacaccaaac tgacctctgg taaaatcgca tcttgc

36

<;210>; 39

<;211>; 36

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 39

gttcaggcaa gatgcgattt taccagaggt cagttt

36

<;210>; 40

<;211>; 41

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 40

ctgaactacg gtctggttca tgttgcaaac aacaactacg a

41

<;210>; 41

<;211>; 41

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 41
gacgggtcgt agttgttgtt tgcaacatga accagaccgt a 41

<;210>; 42
<;211>; 41
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 42
cccgtctggt aaatacgaag gtggaacat ctacaccaa a 41

<;210>; 43
<;211>; 41
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 43
cttctttttt ggtgtagatg ttaccacett cgtatttacc a 41

<;210>; 44
<;211>; 36
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 44
aagaagcatt caacgttgaa cgtgcagatc tgtaag 36

<;210>; 45
<;211>; 34
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 45

tcgacttaca gatctgcacg ttcaacgttg aatg

34

<;210>; 46

<;211>; 35

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 46

aagaagcatt caacgttgaa cagttcgcta aactg

35

<;210>; 47

<;211>; 35

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 47

accggtcagt ttagcgaact gttcaacgtt gaatg

35

<;210>; 48

<;211>; 37

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 48

accggtttca ccctgatggg tcgtgcagat ctgtaag

37

<;210>; 49
<;211>; 35
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 49
tcgacttaca gatctgcacg acccatcagg gtgaa 35

<;210>; 50
<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a DNA encoding a polypeptide which
consists of T cell epitopes derived from cedar
pollen allergens

<;400>; 50
ggatccgcgt ggtatcatcg ca 22

<;210>; 51
<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a DNA encoding a polypeptide which
consists of T cell epitopes derived from cedar
pollen allergens

<;400>; 51
aggtcgactt acagatctgc ac 22

<;210>; 52
<;211>; 316
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed DNA

encoding a polypeptide which consists of T cell
epitopes derived from cedar pollen allergens

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (11)..(298)

<;400>; 52

```

ggatccggt ggt atc atc gca gca tac cag aac ccg gca tct tgg aaa 49
      Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys
        1             5             10

tct atg aaa gtt acc gtt gct ttc aac cag ttc ggt ccg gac atc ttc 97
Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe
      15             20             25

gca tct aaa aac ttc cat ctg cag aaa aac aaa ctg acc tct ggt aaa 145
Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys
      30             35             40             45

atc gca tct tgc ctg aac tac ggt ctg gtt cat gtt gca aac aac aac 193
Ile Ala Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn
        50             55             60

tac gac ccg tct ggt aaa tac gaa ggt ggt aac atc tac acc aaa aaa 241
Tyr Asp Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys
        65             70             75

gaa gca ttc aac gtt gaa cag ttc gct aaa ctg acc ggt ttc acc ctg 289
Glu Ala Phe Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu
        80             85             90

atg ggt cgt gcagatctgt aagtcgac 316
Met Gly Arg
      95

```

<;210>; 53

<;211>; 96

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
peptide which consists of T cell epitopes derived
from cedar pollen allergens

<;400>; 53

```

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys
      1             5             10             15

```

Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys
20 25 30

Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser
35 40 45

Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro
50 55 60

Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe
65 70 75 80

Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg
85 90 95

<;210>; 54

<;211>; 42

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 54

aaatctatga aagttaccgt tgcattcaac cagttcggtc cg

42

<;210>; 55

<;211>; 47

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 55

agatttccaa gatgccgggt tctggtatgc tgcgatgata ccacgcg

47

<;210>; 56

<;211>; 32

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 56
gacatcttcg catctaaaaa cttccatctg ca 32

<;210>; 57
<;211>; 42
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 57
gatgtccgga ccgaactggt tgaaagcaac ggtaactttc at 42

<;210>; 58
<;211>; 37
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 58
gaaaaacaaa ctgacctctg gtaaaatgc atcttgc 37

<;210>; 59
<;211>; 33
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to construct a DNA encoding a
polypeptide which consists of T cell epitopes
derived from cedar pollen allergens

<;400>; 59
gtttttctgc agatggaagt ttttagatgc gaa 33

<;210>; 60

<;211>; 651

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed DNA
 encoding a polypeptide which consists of T cell
 epitopes derived from cedar pollen allergens

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (1)..(642)

<;220>;

<;221>; mat#peptide

<;222>; (4)..(642)

<;400>; 60

atg acc atg att acg aat tcg agc tcg gta ccc ggg gat ccg cgt ggt	48
Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Ser Ser Val Pro Gly Asp Pro Arg Gly	
-1 1 5 10 15	

atc atc gca gca tac cag aac ccg gca tct tgg aaa tct atg aaa gtt	96
Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys Val	
20 25 30	

acc gtt gct ttc aac cag ttc ggt ccg gac atc ttc gca tct aaa aac	144
Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn	
35 40 45	

ttc cat ctg cag aaa aac aaa ctg acc tct ggt aaa atc gca tcc tgc	192
Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys	
50 55 60	

ctg aac tac ggt ctg gtt cat gtt gca aac aac aac tac gac ccg tct	240
Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser	
65 70 75	

ggc aaa tac gaa ggt ggt aac atc tac acc aaa aaa gaa gca ttc aac	288
Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn	
80 85 90 95	

gtt gaa cag ttc gct aaa ctg acc ggt ttc acc ctg atg ggt cgt gca	336
Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg Ala	
100 105 110	

gat ccg cgt ggt atc atc gca gca tac cag aac ccg gca tct tgg aaa	384
Asp Pro Arg Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys	
115 120 125	

tct atg aaa gtt acc gtt gct ttc aac cag ttc ggt ccg gac atc ttc 432
 Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe
 130 135 140

gca tct aaa aac ttc cat ctg cag aaa aac aaa ctg acc tct ggt aaa 480
 Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys
 145 150 155

atc gca tcc tgc ctg aac tac ggt ctg gtt cat gtt gca aac aac aac 528
 Ile Ala Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn
 160 165 170 175

tac gac ccg tct ggt aaa tac gaa ggt ggt aac atc tac acc aaa aaa 576
 Tyr Asp Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys
 180 185 190

gaa gca ttc aac gtt gaa cag ttc gct aaa ctg acc ggt ttc acc ctg 624
 Glu Ala Phe Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu
 195 200 205

atg ggt cgt gca gat ctg taagtcgac 651
 Met Gly Arg Ala Asp Leu
 210

<;210>; 61

<;211>; 214

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide which consists of T cell epitopes derived
 from cedar pollen allergens

<;400>; 61

Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Ser Ser Val Pro Gly Asp Pro Arg Gly
 -1 1 5 10 15

Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys Val
 20 25 30

Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn
 35 40 45

Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys
 50 55 60

Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser
 65 70 75

Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn

80	85	90	95
Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg Ala			
100	105	110	
Asp Pro Arg Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys			
115	120	125	
Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe			
130	135	140	
Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys			
145	150	155	
Ile Ala Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn			
160	165	170	175
Tyr Asp Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys			
180	185	190	
Glu Ala Phe Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu			
195	200	205	

Met Gly Arg Ala Asp Leu
210

<;210>; 62

<;211>; 31

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
introduce a mutation in the pUC18 vector

<;400>; 62

tccggctcgt atgttgtgtg caattgtgag c

31

<;210>; 63

<;211>; 22

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
introduce a mutation in the pUC18 vector

<;400>; 63

agcataaagt gtaaagcctg gg

22

<;210>; 64

<;211>; 32
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
introduce a mutation in the pUC18 vector

<;400>; 64
attgttatcc gtcacaatt gcacacaaca ta 32

<;210>; 65
<;211>; 24
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
introduce a mutation in the pUC18 vector

<;400>; 65
ttcacacagg aaacagctat gacc 24

<;210>; 66
<;211>; 32
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
introduce a mutation in the pUC18M vector

<;400>; 66
tttatgcttc cggtcgtat aatgtgtgca at 32

<;210>; 67
<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
introduce a mutation in the pUC18M vector

<;400>; 67
gtgtaaagcc tgggtgcct aa 22

<;210>; 68
<;211>; 32
<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
introduce a mutation in the pUC18M vector

<;400>; 68

tccgctcaca attgcacaca ttatacgagc cg 32

<;210>; 69

<;211>; 23

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
introduce a mutation in the pUC18M vector

<;400>; 69

taacaatttc acacaggaaa cag 23

<;210>; 70

<;211>; 2686

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Plasmid vector
pUC18M5

<;400>; 70

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctcccgc gcgttgccg attcattaat gcagctggca 60
gcacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120
cactcattag gcaccccagg ctttacctt tatgcttccg gctcgtataa tgtgtgcaat 180
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
cggtaccggg ggatcctcta gattcgacct gcaggcatgc aagcttgga ctggccgtcg 300
ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatgc cttgcagcac 360
atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatgc cttcccaac 420
agttgcgcag cctgaatgac gaatggcgcc tgatgcggta tttctcctt acgcatctgt 480
gggtatttc acaccgcata tggatgactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt 540
taagccagcc ccgacaccgc ccaacaccgc ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgtccc 600

cgcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccggag ctgcatgtgt cagaggtttt 660
 caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatacgcta tttttatagg 720
 ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc 780
 gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 840
 aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gatatgagt attcaacatt 900
 tccgtgtcgc ccttatccccc ttttttcggg cattttgcct tctgttttt gctcaccag 960
 aaacgtggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt ggttacatcg 1020
 aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa 1080
 tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatglg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc 1140
 aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcaaatga cttggttgag tactcaccag 1200
 tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 1260
 ccatgagtga taacactgcg gccaaactac ttctgacaac gatcgaggga ccgaaggagc 1320
 taaccgcttt ttgcacaac atgggggatc atgtaactcg cttgatcgt tgggaaccgg 1380
 agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 1440
 caacgttgcg caaactatta actggcgaa tacttactct agcttcccg caacaattaa 1500
 tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgtcggcc cttccggtg 1560
 gctggtttat tgetgataaa tctggagccg gtgagcgtg gtctcgggt atcattgcag 1620
 cactggggcc agatgtaag cctcccgta tctagttat ctacacgagc gggagtcagg 1680
 caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 1740
 ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt 1800
 aatttaaaag gatctagtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa atccctaac 1860
 gtgagtttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 1920
 atcctttttt tctgcgcgta atctgtgtgt tgcaacaaa aaaaccaccg ctaccagcg 1980
 tggtttgttt gccgatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaagtaact ggttcagca 2040
 gagcgcagat accaaatact gtcttctag ttagccgta gttaggccac cacttcaaga 2100

actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca 2160
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 2220
agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag ctggagcga acgacctaca 2280
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa 2340
aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg aggagcttc 2400
cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 2460
gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 2520
cctttttacg gttcctggcc ttttctggc cttttgetca catgttcttt cctgcgttat 2580
ccccgattc tgttgataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca 2640
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcaagtga gcgaggaagc ggaaga 2686

<;210>; 71

<;211>; 23

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a DNA encoding a polypeptide which
consists of T cell epitopes derived from cedar
pollen allergens

<;400>; 71

ggatcatcg cagcatacca gaa

23

<;210>; 72

<;211>; 22

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a DNA encoding a polypeptide which
consists of T cell epitopes derived from cedar
pollen allergens

<;400>; 72

ttaaccatc aggtgaaac cg

22

<;210>; 73

<;211>; 53
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a DNA encoding a polypeptide which
consists of T cell epitopes derived from cedar
pollen allergens

<;400>; 73
gataacaatt tcacacagga aacagctatg ggtatcatcg cagcatacca gaa 53

<;210>; 74
<;211>; 52
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a DNA encoding a polypeptide which
consists of T cell epitopes derived from cedar
pollen allergens

<;400>; 74
agaggatccc cgggtaccga gctcgaattc ttaacccatc aggggtgaaac cg 52

<;210>; 75
<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a fragment in the pUC18M5 vector

<;400>; 75
gaattcgagc tcggtaccgg gg 22

<;210>; 76
<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a fragment in the pUC18M5 vector

<;400>; 76
catagctgtt tcctgtgtga aa 22

<;210>; 77
<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a fragment in the pUC18M5 vector

<;400>; 77
agagtcgacc tgcagcatg ca 22

<;210>; 78
<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: PCR primer to
amplify a fragment in the pUC18M5 vector

<;400>; 78
cgctcacaat tgcacacatt at 22

<;210>; 79
<;211>; 4613
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: Plasmid
pUCM5-6h73

<;400>; 79
gcgccaata cgcaaacgc ctctccccc gcgttgccg attcattaat gcagctggca 60
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagtttagct 120
cactcattag gcaccccagg ctttacatt tatgcttccg gctcgtataa tgtgtgcaat 180
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatggg tatcatcgca gcataccaga 240
accggcctc ttgaaatct atgaaagtta ccgttgcttt caaccagttc ggtccggaca 300
tcttcgcatc taaaaacttc catctgcaga aaaacaaact gacctctggt aaaatcgeat 360
cttgcttgaa ctacggtctg gttcatgttg caaacaacaa ctacgacccg tctggttaat 420
acgaaggtgg taacatctac accaaaaaag aagcattcaa cgttgaacag ttcgctaaac 480

tgaccggttt caccctgatg ggtaagaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa 540
 cagctatggg tatcatcgca gcataccaga acccgcatc ttggaatct atgaaagtta 600
 ccgttgcttt caaccagttc ggtccgaca tcttcgcac taaaaacttc catctgcaga 660
 aaaacaaact gacctctggt aaaatcgcat cttgcctgaa ctacggtctg gttcatgttg 720
 caaacaacaa ctacgaccg tctgtaaat acgaaggtgg taacatctac accaaaaaag 780
 aagcattcaa cggtgaacag ttcgctaac tgaccggttt caccctgatg ggtaagaat 840
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatggg tatcatcgca gcataccaga 900
 acccgcatc ttggaatct atgaaagtta ccgttgcttt caaccagttc ggtccgaca 960
 tcttcgcac taaaaacttc catctgcaga aaaacaaact gacctctggt aaaatcgcat 1020
 cttgcctgaa ctacggtctg gttcatgttg caaacaacaa ctacgaccg tctgtaaat 1080
 acgaaggtgg taacatctac accaaaaaag aagcattcaa cggtgaacag ttcgctaac 1140
 tgaccggttt caccctgatg ggtaagaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa 1200
 cagctatggg tatcatcgca gcataccaga acccgcatc ttggaatct atgaaagtta 1260
 ccgttgcttt caaccagttc ggtccgaca tcttcgcac taaaaacttc catctgcaga 1320
 aaaacaaact gacctctggt aaaatcgcat cttgcctgaa ctacggtctg gttcatgttg 1380
 caaacaacaa ctacgaccg tctgtaaat acgaaggtgg taacatctac accaaaaaag 1440
 aagcattcaa cggtgaacag ttcgctaac tgaccggttt caccctgatg ggtaagaat 1500
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatggg tatcatcgca gcataccaga 1560
 acccgcatc ttggaatct atgaaagtta ccgttgcttt caaccagttc ggtccgaca 1620
 tcttcgcac taaaaacttc catctgcaga aaaacaaact gacctctggt aaaatcgcat 1680
 cttgcctgaa ctacggtctg gttcatgttg caaacaacaa ctacgaccg tctgtaaat 1740
 acgaaggtgg taacatctac accaaaaaag aagcattcaa cggtgaacag ttcgctaac 1800
 tgaccggttt caccctgatg ggtaagaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa 1860
 cagctatggg tatcatcgca gcataccaga acccgcatc ttggaatct atgaaagtta 1920
 ccgttgcttt caaccagttc ggtccgaca tcttcgcac taaaaacttc catctgcaga 1980

aaaacaaact gacctctggt aaaatcgcat ctgcctgaa ctacggtctg gttcatgtt 2040
caaacaacaa ctacgaccg tctggtaaata acgaaggtgg taacatctac accaaaaaag 2100
aagcattcaa cgttgaacag ttcgctaaac tgaccggttt caccctgatg ggttaagaat 2160
tcgagctcgg tacccgggga tcctctagag tcgacctgca ggcatacaag ctgggcaact 2220
gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg ttaccaact taatgcctt 2280
gcagcacatc ccccttctgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgac ccatcgcct 2340
tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgctga tgcgtatctt tctcttacg 2400
catctgtcgc gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc 2460
gcatagttaa gccagcccg acaccgcca acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt 2520
ctgtcccg catccgcta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag 2580
aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatct 2640
ttataggtta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga 2700
aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatct ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc 2760
atgagacaat aacctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt 2820
caacatttcc gtgtcgcct tattcccttt ttgcggcgt ttgccttcc tgtttttgct 2880
caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt 2940
tacatcgaac tggatctcaa cagcggtgaa atccttgaga gtttcgccc cgaagaacgt 3000
tttccaatga tgagcacttt taaagtctg ctatgtggcg cgttattatc ccgtattgac 3060
gccgggcaag agcaactcgg tcgcccata cactattctc agaatgactt ggttgagtac 3120
tcaccagtca cagaaaagca tcttacgat ggcatgacag taagagaatt atgcagtct 3180
gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg 3240
aaggagctaa ccgtttttt gcacaacatg ggggatcatg taactgcct tgatcgttg 3300
gaaccggagc tgaatgaage catacacaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca 3360
atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccgcaa 3420
caattaatag actggatgga ggcgataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt 3480

ccgctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc 3540
attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgatcg tagttatcta cagcacggg 3600
agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt 3660
aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac ttagattga tttaaaactt 3720
catTTTTaat ttaaaggat ctaggtgaag atcctTTTTg ataatctcat gaccaaactc 3780
ccttaactg agttttcgtt cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaggatct 3840
tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaac tgctgcttgc aaacaaaaa accaccgta 3900
ccagcggtgg ttgtttgcc ggtcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggtaactggc 3960
ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagt aggcaccac 4020
ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgctctgc taatcctgtt accagtggct 4080
gctgccagt gcgataagtc gtgtcttacc gggttggaact caagacgata gttaccgat 4140
aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg 4200
acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa 4260
gggagaaaagg cggacaggt tccggttaag ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg 4320
gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga 4380
cttgagcgtc gatTTTTgtg atgctcgtca gggggcgga gcctatgaa aaacgccagc 4440
aacgcggcct tttacggtt cctggcctt tgctggcctt ttgctcacat gtttttct 4500
gcgttatecc ctgattctgt ggataaccgt attaccgct ttgagtgage tgataccgct 4560
cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcag tcagtgagcg aggaagcga aga 4613

<;210>; 80

<;211>; 4

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Linker peptide

<;400>; 80

Arg Ala Asp Leu

【0196】配列番号51：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを増幅するためのPCRプライマー

配列番号52：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNA

配列番号53：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチド

配列番号54：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを構築するためのオリゴヌクレオチド

配列番号55：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを構築するためのオリゴヌクレオチド

【0197】配列番号56：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを構築するためのオリゴヌクレオチド

配列番号57：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを構築するためのオリゴヌクレオチド

配列番号58：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを構築するためのオリゴヌクレオチド

配列番号59：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを構築するためのオリゴヌクレオチド

配列番号60：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNA

【0198】配列番号61：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチド

配列番号62：pUC18ベクターに変異を導入するためのPCRプライマー

配列番号63：pUC18ベクターに変異を導入するためのPCRプライマー

配列番号64：pUC18ベクターに変異を導入するためのPCRプライマー

配列番号65：pUC18ベクターに変異を導入するためのPCRプライマー

【0199】配列番号66：pUC18Mベクターに変異を導入するためのPCRプライマー

配列番号67：pUC18Mベクターに変異を導入するためのPCRプライマー

配列番号68：pUC18Mベクターに変異を導入するためのPCRプライマー

配列番号69：pUC18Mベクターに変異を導入するためのPCRプライマー

配列番号70：プラスミドベクターpUC18M5

【0200】配列番号71：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを増幅するためのPCRプライマー

配列番号72：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを増幅するためのPCRプライマー

配列番号73：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを増幅するためのPCRプライマー

配列番号74：複数のスギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープからなるペプチドをコードするDNAを増幅するためのPCRプライマー

配列番号75：pUC18M5ベクター中の断片を増幅するためのPCRプライマー

【0201】配列番号76：pUC18M5ベクター中の断片を増幅するためのPCRプライマー

配列番号77：pUC18M5ベクター中の断片を増幅するためのPCRプライマー

配列番号78：pUC18M5ベクター中の断片を増幅するためのPCRプライマー

配列番号79：プラスミドpUCM5-6h73

配列番号80：リンカーペプチド

【図面の簡単な説明】

【図1】スギアレルゲンエピトープ・連結ペプチド重合タンパク質発現プラスミド構築の概要。

【図2】pUC(h6-1)₂、pUC(h7-1)₂、およびpUC(h7-3)₂で発現される重合タンパク質の模式図。

【図3】RC-PCR法によるpUC18MおよびpUCM5構築の概要。

【図4】発現ベクターpUC18M、およびpUCM5の発現調節領域の模式図。

【図5】RC-PCR法によるpUCM5-h73構築の概要。

【図6】リボソーム結合領域を含むh7-3遺伝子の多コピー化の概要。

【図7】スギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープ連結ペプチド（ペプチド1およびペプチド9）とT細胞エピトープ混合物のヒトT細胞増殖刺激活性の比較。

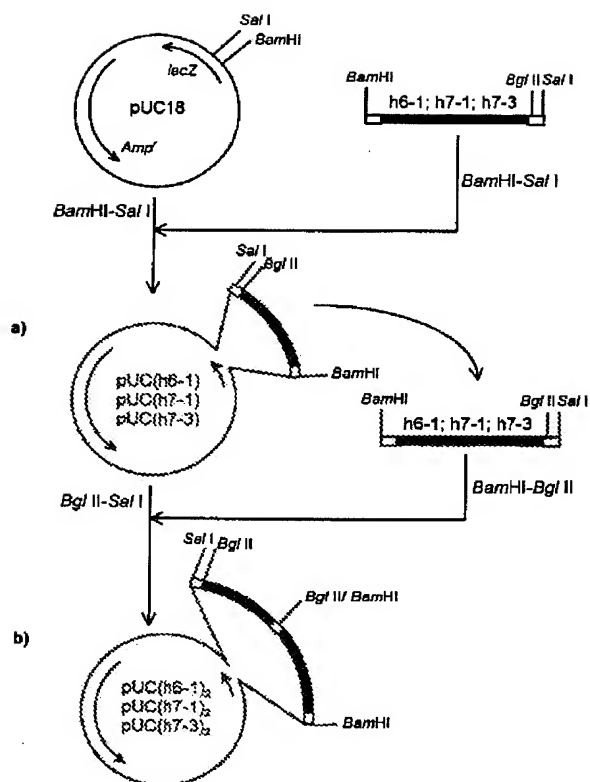
【図8】スギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープ連結ペプチド（ペプチド2およびペプチド3）とT細胞エピトープ混合物のヒトT細胞増殖刺激活性の比較。

【図9】スギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープ連結ペプチド（ペプチド4およびペプチド10）とT細胞エピトープ混合物のヒトT細胞増殖刺激活性の比較。

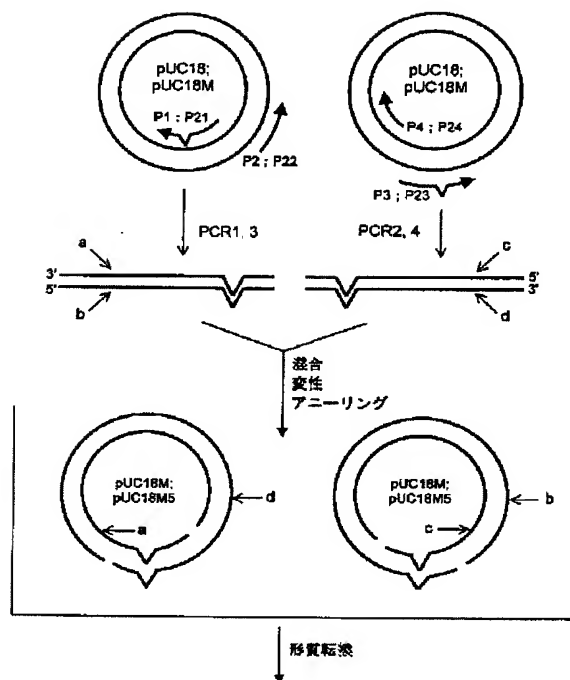
【図10】スギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープ連結ペプチド（ペプチド5およびペプチド6）とT細胞エピトープ混合物のヒトT細胞増殖刺激活性の比較。

【図11】スギ花粉アレルゲン由来T細胞エピトープ連結ペプチド（ペプチド11およびペプチド12）とT細胞エピトープ混合物のヒトT細胞増殖刺激活性の比較。

【図1】



【図3】



【図2】

(Met) -Thr-Met-Ile-Thr-Asn-Ser-Ser-Ser-Val-Pro-Gly-Asp-Pro-Arg-

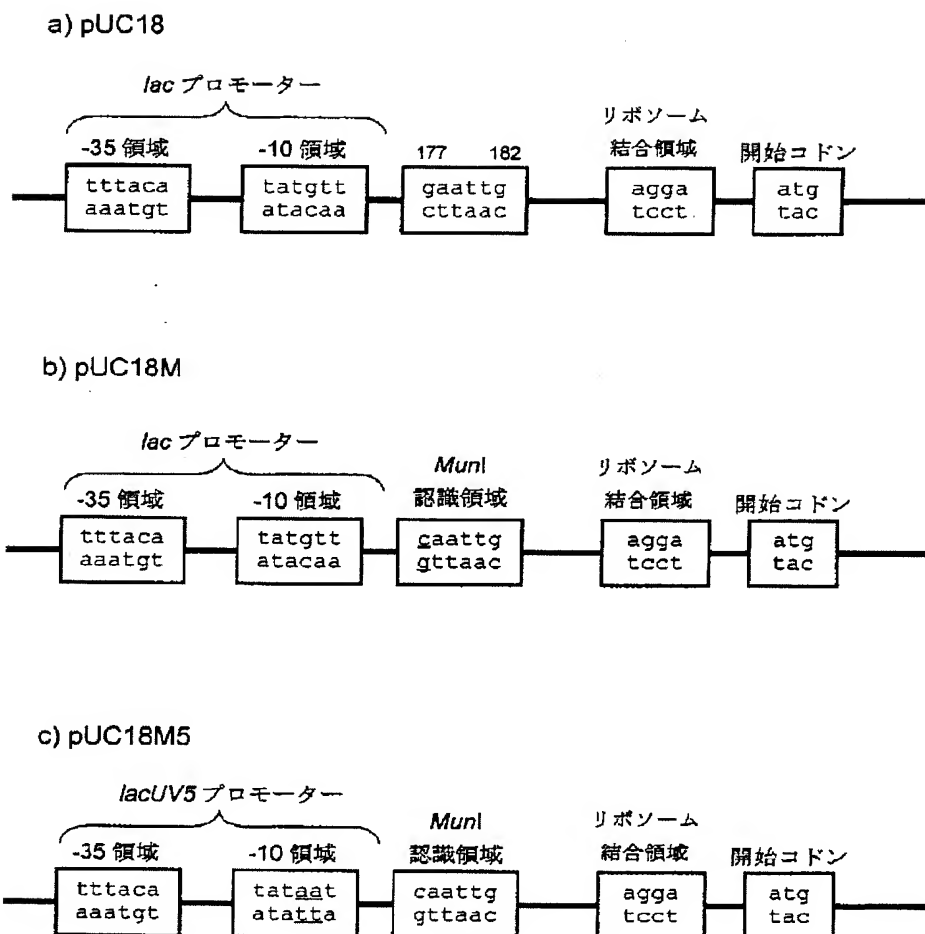
H6-1; H7-1; H7-3

-Arg-Ala-Asp-Pro-Arg-

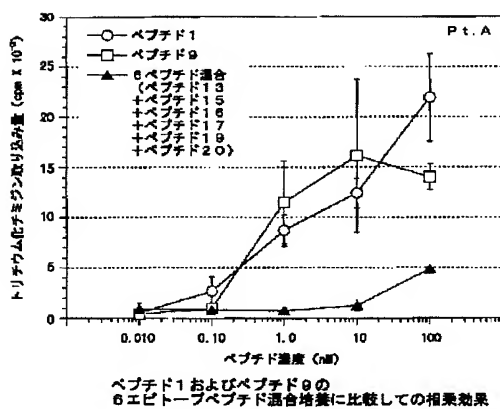
H6-1; H7-1; H7-3

-Arg-Ala-Asp-Leu

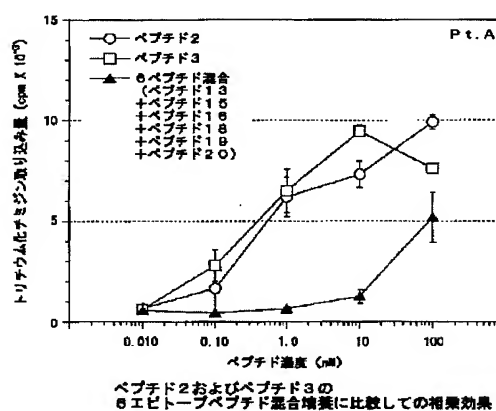
【図4】



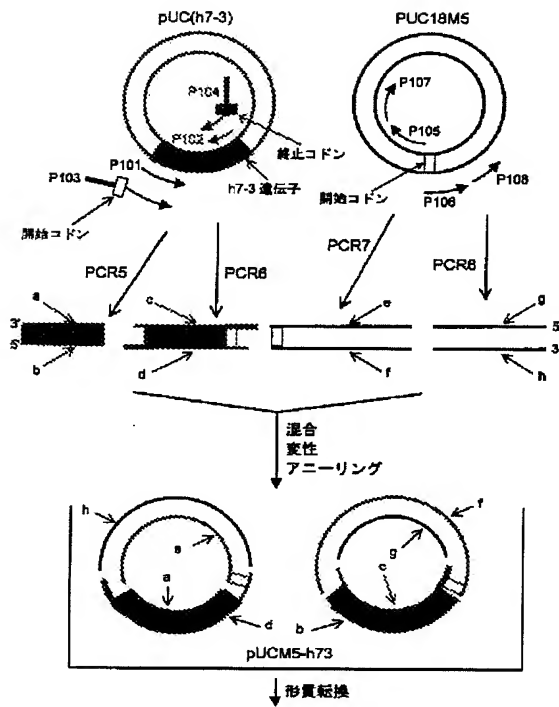
【図7】



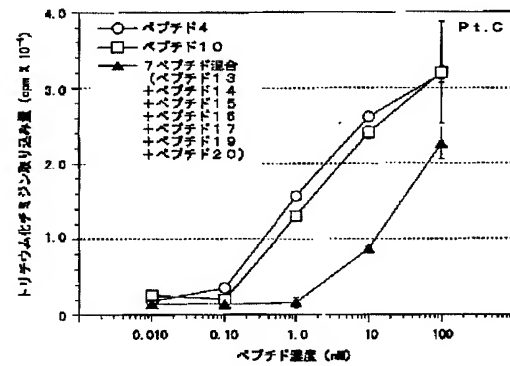
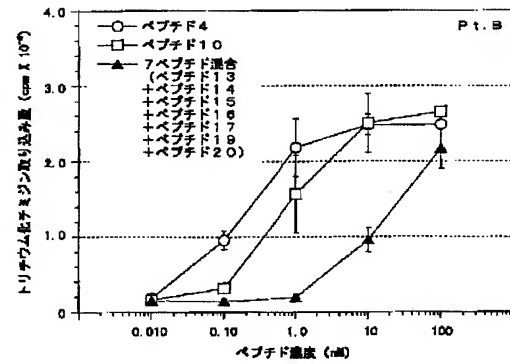
【図8】



【図5】

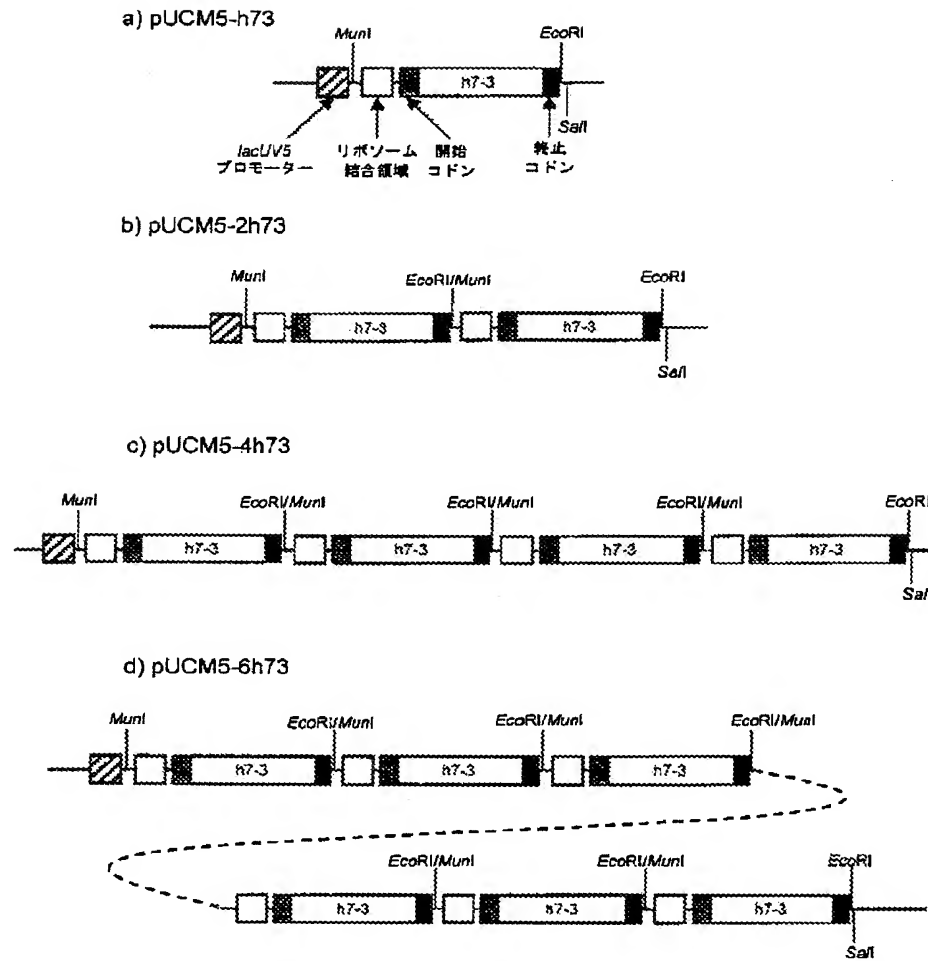


【図9】

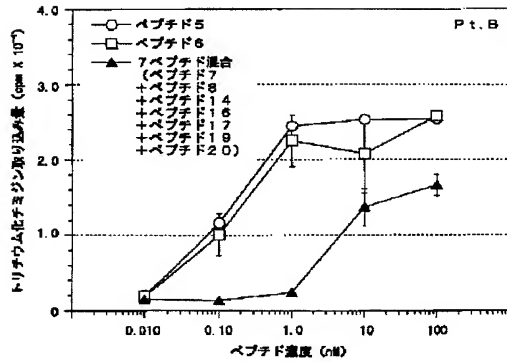


ペプチド4およびペプチド10の
7ペプチド混合培養に比較しての相乗効果

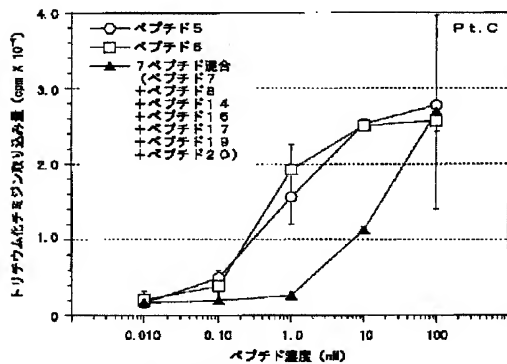
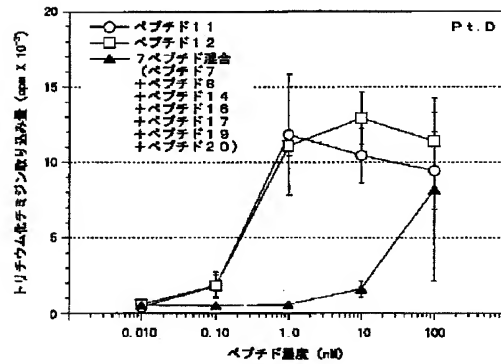
【図6】



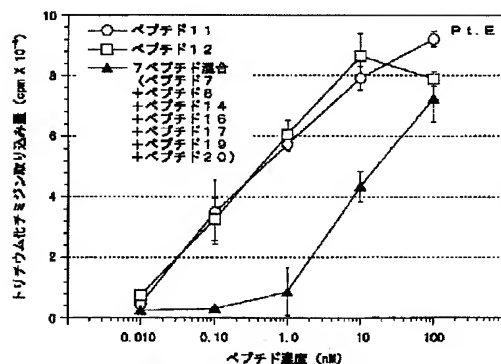
【図10】



【図11】



ペプチド5およびペプチド6の
7エピトープペプチド混合培養に比較しての相乗効果



ペプチド11およびペプチド12の
7エピトープペプチド混合培養に比較しての相乗効果

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テマコード (参考)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

1/19

1/21

1/21

C 1 2 P 21/02

C

5/10

A

15/09 Z N A

A 6 1 K 37/02

C 1 2 P 21/02

C 1 2 N 5/00

A

15/00

Z N A A

(72) 発明者 川口 淳子

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株
式会社内

(72) 発明者 白石 明郎

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株
式会社内

(72) 発明者 切中 秀世

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株
式会社内

(72) 発明者 芹澤 伸記

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株
式会社内